

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2010

Meeri Säily

Hypoksian ja sädehoidon vaikutus levyepiteelikarsinooman kasvuun *in vitro*



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Meeri Säily

Hypoksian ja sädehoidon vaikutus levyepiteelikarsinooman kasvuun *in vitro*

Tämä opinnäytetyö on tehty Valtakunnallisen PET-keskuksen prekliinisen kuvantamisen tutkimuslaboratoriossa. Työn tarkoituksena oli tutkia hypoksian ja sädehoidon vaikutusta levyepiteelikarsinooman kasvuun *in vitro*.

Työ koostuu kolmesta eri osa-alueesta. Työssä määritettiin pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomista eristettyjen solulinjojen generaatioajat kasvukäyrien avulla normoksiaolosuhteissa (21 % O₂). Tämän lisäksi tutkittiin hypoksian (1 % O₂) vaikutusta solujen kasvuun ajan funktiona ja sädehoidon vaikutusta, määrittämällä solulinjojen säderesistenssi eli solujen kyky selviytyä niihin kohdistetusta sädetyksestä. Säderesistenssimäärittäminen tehtiin 96-kuoppalevy menetelmällä, jossa sädetetyt solut pipetoitiin kuoppalevyille kasvamaan. Kasvukäyrämääritykset tehtiin 6-kuoppalevyillä, joten olennaisena osana oli myös solumäärien optimointi määrittämisensä varten.

Tulokset osoittavat, että niiden solulinjojen, joilla oli nopeampi generaatioaika normoksiassa, kasvuvauhti hidastui oleellisesti hypoksia-olosuhteissa verrattuna hitaamman generaatioajan saavuttaneisiin solulinjoihin. Ne solulinjat, joilla oli hitaampi generaatioaika hidastivat, mutta jatkoivat selkeästi jakautumistaan hypoksia-olosuhteissa. Määritysten perusteella osa solulinjoista selviytyy paremmin hypoksisissa-olosuhteissa kuin toiset. Hypoksia on usein merkki säderesistentistä ja aggressiivisesta karsinoomasta. Solulinjat erosivat toisistaan myös morfologialtaan. Siitä huolimatta, että analyysien toteuttamisessa on kehittämisen varaa, antoi jokainen analyysistä saatu tulos lisäarvoa alkuperäiselle tutkimukselle.

ASIASANAT:

pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma, hypoksia, kasvukäyrä, säderesistenssimäärittäminen

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

May 2010 | Total number of pages: 49

Instructors: Tove Grönroos, Ph.D., M.Sc.; Kari Haajanen, M.Sc.

Meeri Säily

Effect of hypoxia and radiotherapy on growth of squamous cell carcinoma *in vitro*

This Bachelor's Thesis project was carried out at the Preclinical Imaging unit at Turku PET Centre. The aim of this thesis was to study the effect of hypoxia and radiotherapy on the growth of squamous cell carcinoma *in vitro*.

This thesis consists of three different areas, namely determination of the generation time of cell lines under normoxia (21% O₂), evaluation of the effect of hypoxia (1% O₂) on cell growth, and determination of the effect of radiotherapy on the growth of cells.

Growth curve determinations were performed in 6-well culture plates. The 96-well clonogenic assay method was used for radio resistance determinations of irradiated cells that were plated in 96-well culture plates and incubated for three weeks.

The results showed that cell lines with a shorter generation time under normoxic conditions did respond to hypoxia by decreasing the generation time more readily than cell lines with a longer normoxic generation time. The cell lines with a longer normoxic generation time continued dividing under hypoxic conditions even though their generation time decreased. According to this study some cell lines are more capable of surviving under hypoxia than others. Hypoxic cells are often resistant to radiotherapy and hence make hypoxic tumors more aggressive.

The results achieved in this study brought additional value to the research project, even though some methodological improvements can be considered in the future.

KEYWORDS:

head and neck squamous cell carcinoma, hypoxia, growth curve, radio resistance

KÄYTETYT LYHENTEET JA MÄÄRITELMÄT

MBq	Mega becquerel (Bq = 1/s)
HNSCC	Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma (Head and neck squamous cell carcinoma)
HPV	Human papillomavirus
UICC	International Union Against Cancer
mmHg	Elohopeamillimetri (760 mmHg = 1 atm = 101,3 kPa)
[¹⁸ F]FDG	¹⁸ F-leimattu fluorideoksiglukoosi, eli glukoosin analogiyhdiste
UT	Turun yliopisto (University of Turku)
SCC	Levyepiteelikarsinooma (squamous cell carcinoma)
Passage	Jaettaessa soluja, niiden passage (p) kasvaa. Mitä vanhempi solulinja on, sitä suurempi on passage.
AUC	Eloonjäämiskäyrän alapuolelle jäävä alue (Area under the curve)
SF	Surviving fraction

SISÄLTÖ

JOHDANTO	5
1 SYÖPÄKASVAIN	7
1.1 Pään ja kaulan alueen syöpä	8
1.1.1 Levyepiteelisyöpä ja sen synty	10
1.2 Syövän asteet ja luokitus	12
1.3 Syövän hoito	13
1.4 Kasvaimen mikroympäristö	15
1.4.1 Angiogeneesi	15
1.4.2 Hypoksia kasvaimessa	16
2 KÄYTETYT SOLULINJAT JA MENETELMÄT	19
2.1 Työssä käytetyt solulinjat	19
2.2 Solujen viljely	20
2.3 Kasvukäyrien valmistus normoksiassa	21
2.4 Hypoksiakasvukäyrien valmistus	21
2.5 Säderesistenssimäärittäminen	22
2.5.1 Säderesistenssin määrittäminen	23
3 TULOKSET	27
3.1 Solulinjojen morfologiasta ja kasvutavoista	27
3.2 Normoksiakasvukäyrät	29
3.3 Hypoksiakasvukäyrät	32
3.4 Säderesistenssimäärittäminen	36
4 TULOSTEN TARKASTELU	38
4.1 Solujen erot kasvutavoissa	38
4.2 Kasvukäyrät	39
4.3 Säderesistenssimäärittäminen	45
5 YHTEENVETO	46
LÄHTEET	47
LIITTEET	

KUVAT

Kuva 1 Pään ja kaulan alueen syövän esiintymisalueet	9
Kuva 2 Poikkileikkaus ihon kerroksista	10
Kuva 3 Levyepiteelisyövän muodostuminen	11
Kuva 4 Normaalin kudoksen ja kasvaimen verisuonistot	16
Kuva 5 Akuutti ja krooninen hypoksia kasvaimessa	17
Kuva 6 Sädetyksessä käytetty pleksifantomi	25
Kuva 7 Tutkimuksessa käytettyjen solujen morfologia	27
Kuva 8 UT-SCC-8 p 30 normoksiakasvukäyrä	30
Kuva 9 UT-SCC-25 p 5 normoksiakasvukäyrä	30
Kuva 10 UT-SCC-70 p 24 normoksiakasvukäyrä	31
Kuva 11 UT-SCC-72 p 17 normoksiakasvukäyrä	31
Kuva 12 UT-SCC-74 p 37 normoksiakasvukäyrä	32
Kuva 13 UT-SCC-8 p 28 hypoksiakasvukäyrä	33
Kuva 14 UT-SCC-25 p 8 hypoksiakasvukäyrä	33
Kuva 15 UT-SCC-70 p 24 hypoksiakasvukäyrä	34
Kuva 16 UT-SCC-72 p 16 hypoksiakasvukäyrä	34
Kuva 17 UT-SCC-74 p 31 hypoksiakasvukäyrä	35
Kuva 18 UT-SCC-70 p 17 eloonkäämiskäyrä	37
Kuva 19 UT-SCC-72 p 20 eloonjäämiskäyrä	37

TAULUKOT

Taulukko 1 Pään ja kaulan alueen syöpien TNM luokitus	13
Taulukko 2 UT-SCC solulinjat	19
Taulukko 3 Säderesistenttimäärityksen 96-kuoppalevyjen valmistus	24
Taulukko 4 UT-SCC -solulinjojen kasvutavat ja morfologiat	28
Taulukko 5 Solujen generaatioajat normoksia-olosuhteissa	29
Taulukko 6 UT-SCC-70 p17 –linjan selviytyminen sädetyksestä	36
Taulukko 7 UT-SCC-72 p20 –linjan selviytyminen sädetyksestä	36

JOHDANTO

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli määrittää ja verrata eri pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooma -solulinjojen kasvunopeuksia normoksia- (21 % O₂) ja hypoksia- (1 % O₂) olosuhteissa. Tämän lisäksi määritettiin kahden solulinjan säderesistenssi, eli solujen kyky sietää ja selviytyä niihin kohdistetusta sädetyksestä. Tutkimuksen tavoitteena oli saada kuva yksittäisten solulinjojen käyttäytymisestä. Solulinjajoukon tuloksia ei analysoida tilastollisesti.

Työ voidaan jakaa kolmeen osa-alueeseen:

- Solumäärien optimointi kasvukäyriä varten ja kasvukäyrien määrittäminen
- Solujen kasvatus hypoksiassa ja hypoksian vaikutuksen määrittäminen solujen kasvuun ajan funktiona
- Solujen säderesistenssin määrittäminen

Solujen karakterisointi, kunnon ja elinvoiman seuranta kuului merkittävänä osana työn jokaisen osa-alueen toteuttamiseen.

Opinnäytetyö on osa laajempaa hanketta, jonka tarkoituksena on selvittää voidaanko PET-menetelmällä kuvantaa hypoksian aiheuttamia geneettisiä eroja kasvaimessa. Positroniemissiotomografialla eli PET-menetelmällä kuvannetaan biokemiallisia ja fysiologisia reaktioita *in vivo*. PET tutkimuksessa käytetään pienenpieniä määriä positroneja emittoivilla isotoopeilla leimattuja biologisesti aktiivisia komponentteja kuten luonnollisia substraatteja, substraatti analogeja ja lääkkeitä.¹ Substraatin määrä on nmol:in luokkaa, sillä spesifinen radioaktiivisuus, jolla substraatti on leimattu on korkea, yleensä MBq/nmol substraattia kohden. Koska potilaaseen saatettavan merkkiaineen määrä on massaltaan pieni mahdollistaa tämä tapahtumien tutkimisen ilman farmakologisia sivuvaikutuksia. Leimattu merkkiaine saatetaan potilaaseen inhalaationa tai injektiona². Isotoopilla leimatun merkkiaineen jakaumaa

elimistössä tutkitaan ajan ja paikan suhteen¹ PET kerroskuvausmenetelmällä². Koska merkkiaine käyttäytyy elimistössä kuten kyseinen aine luonnollisestikin käyttäytyy, voidaan tutkimuksessa monitoroida esimerkiksi aineenvaihduntatapahtumia, verenvirtausta ja geenien ekspressiota¹. Tavallisimmin käytettäviä radioisotooppeja ovat ¹⁵O, ¹³N, ¹¹C ja ¹⁸F². Merkkiaineina voivat olla esimerkiksi happi, rasvahappo- ja glukoosianalogit, reseptoreiden välittäjäaineet tai spesifiset vasta-aineet.

1 SYÖPÄKASVAIN

Terveiden yksilöiden kudosten kehityskaaren tapahtumia valvoo ja toteuttaa geenitoiminnot. Toimintaketjun säätelyn ja geenipohjaisen ohjauksen pettäminen aiheuttaa usein sairauksia, joista pahin on syöpä. Kantasoluja lukuun ottamatta erikoistuneen kudoksen solut eivät yleisesti ottaen enää jakaannu, vaan ne toimivat tehtävässään erilaistuneina soluina.

Normaalia solunjakautumista aktivoivia geenejä nimitetään proto-onkogeeneiksi tai sellulaarisiksi onkogeeneiksi (c-onc). Proto-onkogeeneistä muodostuu onkogeenejä eli syöpää aiheuttavia geenejä jos niiden geeneissä tai geenien säätelyosissa tapahtuu rakennemuutoksia, jotka johtavat virheelliseen geenitoimintaan ja jatkuvan solunjakautumisen aktivointiin. Proto-onkogeeni voi muuttua onkogeeniksi myös translokoituessaan eli geenin siirtyessä aktiivisen promootorin alaisuuteen. Isäntäsolun geenialueesta voi insertoitua ja välittyä edelleen myös virusten kuljettamina seuraavaan solusisäntään. Erityisesti RNA-virukset voivat toimia kuljettajina. Viraalinen onkogeeni (v-onc) voi insertoitua isäntäsolun kromosomiin ja toimia aktiivisena onkogeeninä eli aiheuttaa syöpää.

Normaalia solun kehitystä ja jakautumista säätelevät paitsi proto-onkogeenit, myös solunjakautumista inhiboivat säätelygeenit. Näitä kasvunrajoitegeenejä nimitetään tuumorisupressorigeeneiksi tai antionkogeeneiksi. Tuumorisupressorigeenejä tunnetaan useita. Ne vaikuttavat solunjakautumisen säätelyketjun eri osavaiheisiin ja eri kohdemolekyyleihin. Syövän kehityksen loppuvaiheisiin liittyy usein tuumorisupressorien molempien alleelien deleetio, mikä aiheuttaa syöpäkasvun hillittömän etenemisen. Eli jos vastinkromosomeista toinen sisältää toiminnallisesti puutteellisen tai puuttuvan tuumorisupressorigeenin (vioittunut geeni tai deleetio) tarvitaan tämän lisäksi myös toinen geenialueen deleetio taikka rakennemuutos vastinkromosomissa, jotta supressio laukeaa ja mahdollistaa syöpäkasvun. Vioittuneen tuumorisupressorigeenin periytyminen aiheuttaa täten syöpäriskin. Yksi merkittävimmistä tuumorisupressorigeeneistä on geeni p53.

DNA:n korjausmekanismit pyrkivät pitämään geeniaineksen virheettömänä. Korjausmekanismien häiriöt johtavat kromosomiston sattumanvaraisiin muutoksiin. Muutosten kohteiksi voivat joutua myös onkogeeneit ja tuumorisupressorigeeneit. Syövän kehittymisen voi käynnistää vauriot, virheet ja toiminnan lakkaaminen missä tahansa yllä mainitussa järjestelmässä. Tavallisesti syövän kehittyminen on moniportainen tapahtumasarja, joka sisältää tyypillisesti altistuksia, rakennemuutoksia kromosomeissa, muutoksia geenitoiminnassa ja lopulta solusyklin säätelyjärjestelmän pettämisen. Säätelyjärjestelmän pettäminen aiheuttaa syöpäsolujen karkaamisen kudostarkonrollin alaisuudesta, jolloin ne lisääntyvät villisti, muodostavat kasvaimia ja lähettävät etäispesäkkeitä sekä tuhoavat tervettä kudosta tieltään.

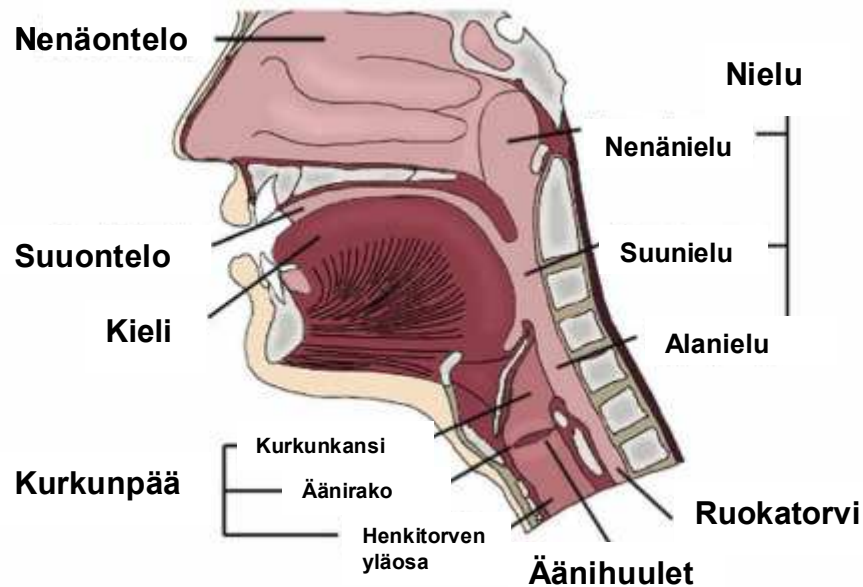
Replikaatioentsyymien oikolukutoiminta pyrkii valvomaan DNA:n virheettömyyttä replikaation aikana. Välittömästi aktivoituvat korjausmekanismit pyrkivät korjaamaan solusyklin muissa vaiheissa tapahtuvat DNA:n vauriot. Usealla eri korjausmekanismilla on omat entsyymitoimintansa. Myös korjausmekanismeissa voi tapahtua häiriöitä kuten geenivaurioita korjausentsyymien geenissä, jolloin toimintakykyistä entsyymiä ei synny. Molempien alleelien vaurio estää DNA-virheiden korjauksen.³

1.1 Pään ja kaulan alueen syöpä

Syöpärekisterin mukaan Suomessa diagnosoitiin 26 000 uutta syöpätapausta vuonna 2007. Näistä 663 potilaalla syöpä todettiin pään tai kaulan alueella. Pään ja kaulan alueen syöpäpotilaiden osuus Suomessa on siis noin 2,5 % kaikista syöpäpotilaista.⁴ Maailmanlaajuisesti noin 6 % kaikista todetuista syövistä sijaitsee pään ja kaulan alueella⁵.

Pään ja kaulan alueen syöviksi luokitellaan suussa, nielussa, nenässä tai kurkussa esiintyvät syövät^{6,7,8,9}. Huulissa, ikenissä, huulten ja posken välissä, luussa suun yllä, kielen etuosassa ja kielen alla esiintyvät syövät luokitellaan suusyöväksi. Nielusyöpä käsittää kaikissa kolmessa nielun osassa (nenänielu, suunielu ja alanielu) ilmenevät syövät. Kurkunpäänsyöpää voi esiintyä äänihuulissa ja kurkunkannessa. Näiden lisäksi pään ja kaulan alueen syöväksi

luokitellaan nenässä, nenän sivuonteloissa ja suun alla olevissa sylkirauhasissa esiintyvät syövät (kuva 1 kuva muokattu⁹). Näistä nielun, suuontelon ja kurkunpään syövät ovat tyypillisesti levyepiteelisiä syöpiä.⁶



Kuva 1 Pään ja kaulan alueen syövän esiintymisalueet

Pään ja kaulan alueen syöivistä suurin osa on levyepiteelisyöpiä⁸. Rauhassyöviksi luokitellaan nenän sivuontelossa, nenässä ja sylkirauhasissa olevat syövät⁶.

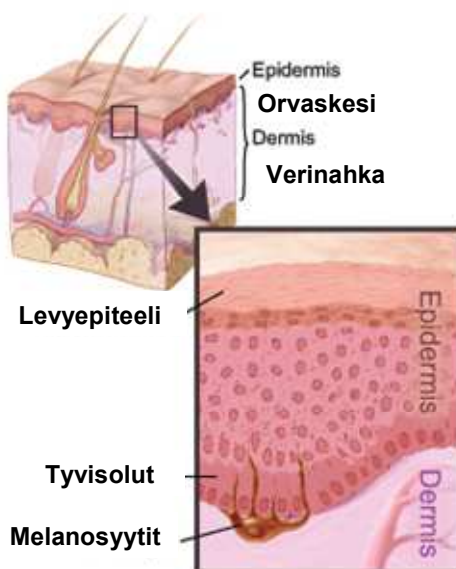
Eniten pään ja kaulan alueen levyepiteelisyöpää esiintyy yli 50 vuotiailla miehillä⁶. Suurimmat riskitekijät pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövän syntyyn ovat tupakka ja alkoholi^{6,5,8,10}. Ruokavaliolla on myös havaittu olevan vaikutus pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövän muodostumiseen. Vähäinen hedelmien ja vihreiden kasvien nauttiminen voi lisätä riskiä sairastua HNSCC syöpään^{6,8}. Kasvaneen riskin aiheuttaa kasvien ja hedelmien sisältämien hivenaineiden, kuten flavonoidien liian pieni saanti¹¹.

Pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövän esiintyvyydessä on paikallisia eroja. Aasiassa HNSCC on paljon yleisempi kuin länsimaissa. Tämä johtuu muun muassa perinteisen päihdyttävän betelpähkinän pureskelusta⁸. Koska pään ja kaulan alueen syöpää todetaan myös potilailla, jotka eivät polta tupakkaa tai

käytä alkoholia, voi syöpään olla myös perinnöllisiä taipumuksia⁶. Ne HNSCC:n potilaat, jotka eivät polta tupakkaa ovat usein sairastuneet joko suhteellisen nuorena tai suhteellisen vanhana. Tupakoivat potilaat ovat sairastuneet 50 vuoden iässä.⁷ Edellisten lisäksi myös papilloomavirukset voivat aiheuttaa pään ja kaulan alueen syöpää¹².

1.1.1 Levyepiteelisyöpä ja sen synty

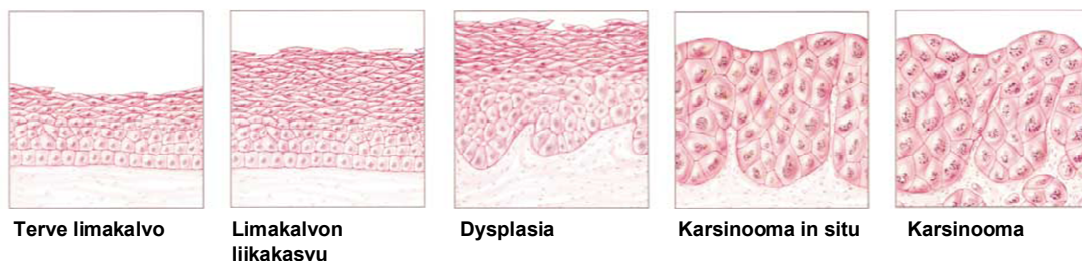
Levyepiteelisyöpä muodostuu mm. ihon epidermiksestä eli orvaskesistä (kuva 2 muokattu¹³) tai kohdunkaulaa, ruokatorvea ja suuta reunustavasta monisolukerroksisesta epiteelistä. Tekijät, jotka vaikuttavat levyepiteelisyöpien yleisyyteen, ennusteeseen ja syntyyn vaihtelevat paljon riippuen siitä, mistä kudoksesta syöpä on peräisin. Epidermaalinen levyepiteelikarsinooma aiheutuu usein UV-valon aiheuttamasta mutaatioista p53-geenissä, kun taas yksi kohdunkaulasyövän aiheuttaja on HPV infektiot.¹⁴



Kuva 2 Poikkileikkaus ihon kerroksista

Pään ja kaulan alueella esiintyvä levyepiteeli on kerrostunutta levyepiteeliä. Kerrostuneessa levyepiteelissä kudoksen puolella olevat solut ovat muodoltaan kuutiomaisia, mutta muuttuvat litistyneiksi pintaa kohti mentäessä. Kuva 3 (kuva

muokattu⁷) esittää levyepiteelisyövän muodostumisen normaalista limakalvosta karsinoomaksi. On tyypillistä että pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövät kehittyvät monista kasvainalueista ja niiden todennäköisyys lähettää etäpesäkkeitä ennen diagnoosia on korkea.¹⁴



Kuva 3 Levyepiteelisyövän muodostuminen

Dysplasia käsittää muutoksia solun koossa, järjestyksessä sekä muodossa. Epiteelidysplasiassa esiintyy häiriintymistä solukon keskinäisessä järjestäytymisessä. Solun sekä tuman koossa ja muodossa sekä värjäytymisessä tapahtuu muutoksia ja mitoosien määrä lisääntyy. Dysplasian ja karsinooma in situ -syövän välillä on vain pieni ero. Kun epiteelin pintasolukko ei enää erilaistu kutsutaan sitä nimellä karsinooma in situ.¹⁵ Karsinooma on epiteelistä lähtöisin oleva pahanlaatuinen syöpäkasvain¹⁶.

Kuten muissakin syövyissä, myös HNSCC:n syntyyn vaikuttavat soluissa tapahtuvat muutokset tuumorisuppressorigeeneissä ja proto-onkogeeneissä. HNSCC tapauksista noin puolet sisältävät p53 -geenin mutaation⁷. Tämä mutaatio on selkeästi yleisempi niillä potilailla, jotka ovat tupakoineet⁵. Mutatoitunut ja toimimaton p53 proteiini aiheuttaa kasvaimen muuttumisen invasiiviseksi, jolloin kasvaimen solut tunkeutuvat muihin kudoksiin muodostaen etäpesäkkeitä. HPV positiivisilla potilailla ilmenee vähemmän p53 -geenin mutaatioita kuin mitä HPV negatiivisilla potilailla. HPV positiivisilla potilailla onkin todettu olevan paremmat selviytymismahdollisuudet kuin HPV negatiivisilla potilailla. Noin joka kolmannessa HNSCC tapauksessa sykliini-D1 onkogeenin tuotto on normaalia runsaampaa. Tämä aiheuttaa solusyklin jatkuvan etenemisen ja edistää siten normaalin limakalvon muuttumisen lopulta karsinoomaksi.⁷

1.2 Syövän asteet ja luokitus

Syövän TNM luokitus kuvaa kasvaimen suuruutta ja levinneisyyttä, sitä käytetään yleisesti pahanlaatuisten syöpien luokituksessa¹⁷. UICC:n ylläpitämä, maailmanlaajuinen TNM luokitusjärjestelmä on ollut käytössä yli 50 vuoden ajan. Sitä täydennetään säännöllisesti vastaamaan nykyisiä käsityksiä pahanlaatuisista syövistä. Luokitusta käytetään hyväksi myös potilaan elinaikaa arvioitaessa.¹⁸

TNM luokituksessa T kirjain kuvaa primäärikasvaimen kokoa (T0-T4), N kuvaa primaarikasvaimen leviämistä lähellä oleviin imusolmukkeisiin (N0-N3) ja M mahdollisesti esiintyviä metastaaseja eli etäpesäkkeitä (M0, M1)^{17,19}. Jokaiselle eri primäärisyövälle on oma luokituksensa. Pään ja kaulan alueen syövän TNM luokituksen perustelut ovat listattuna taulukossa 1 (taulukko muokattu¹⁹).

Kasvainten G arvot kuvaavat syövän histologista erilaistumisastetta. Normaalista kudosta muistuttavat G1 arvon kasvaimet. Niiden on ajateltu olevan vähiten aggressiivisiä syöpiä. G2 luokan kasvaimet ovat kohtalaisesti erilaistuneita, mutta muistuttavat ulkonäöltään vielä alkuperäistä kudosta. Luokan G3 kasvaimet ovat heikosti erilaistuneet ja luokan G4 erilaistumattomia eivätkä muistuta alkuperäistä kudosta. Silloin, kun G luokkaa ei kyetä määrittämään käytetään merkintää GX.²⁰

Kriittisimpiä HNSCC hoidossa ja selviytymisennusteen tekemisessä ovat etäpesäkkeet. Mikäli etäpesäkkeet havaitaan kyllin aikaisin välttytään peräkkäisiltä hidoilta ja rajuilta leikkauksilta, ja näin potilaan todennäköisyys parantua syövästä paranee.²¹ HNSCC:n todentamiseen käytetään mm. magneettikuvausta, tietokonetomografiaa ja positroniemissiotomografiaa⁷.

Taulukko 1 Pään ja kaulan alueen syöpien TNM luokitus

Taulukon luokitus on tehty suuontelon syövän mukaan. Tuumoriluokitus (T) vaihtelee primaarituumorin mukaan. Imusolmukeluokitukset (N) ja metastaasiluokitukset (M) ovat kaikille pään ja kaulan alueen syöville samat.¹⁹

Symboli	Määritelmä
TX	Primäärituوريا ei pystytä arvioimaan
T0	Ei havaintoa primäärituumorista
Tis	Karsinooma <i>in situ</i>
T1	Tuumorin koko ≤ 2 cm
T2	Tuumorin koko > 2 cm, mutta ≤ 4 cm
T3	Tuumorin koko > 4 cm
T4	Tuumori tunkeutunut vierekkäisiin rakenteisiin (luun kuoriosaan, kielen syviin lihaksiin, ihoon, poskionteloon)
NX	Paikallisia imusolmukkeita ei pystytä arvioimaan
N0	Paikallisia imusolmukemetastaaseja ei ole
N1	Metastaasi yksittäisessä samanpuoleisessa imusolmukkeessa (≤ 3 cm)
N2	a Metastaasi yksittäisessä samanpuoleisessa imusolmukkeessa (> 3 cm, mutta ≤ 6 cm) b Metastaasi monessa samanpuoleisessa imusolmukkeessa (≤ 6 cm) c Metastaasi molemminpuolisissa imusolmukkeissa tai vastakkaisissa imusolmukkeissa (≤ 6 cm)
N3	Metastaasi imusolmukkeessa (> 6 cm)
MX	Etäisiä metastaaseja ei pystytä arvioimaan
M0	Ei havaintoja etäisistä metastaaseista
M1	Etäisiä metastaaseja

1.3 Syövän hoito

Pääsääntöisesti tämän päivän hoidot perustuvat leikkaukseen, soluja tappaviin hoitoihin kuten kemoterapiaan ja sädehoitoon tai niiden yhdistelmiin. Sädehoidossa säteilyannoksen suuruutta rajoittavat kasvaimen ympärillä olevat normaalit kudokset. Nopeasti jakautuvien solujen, kuten luuytimen, karvatupen ja ruuansulatuskanavan epiteelisolujen kuoleminen solusalpaajiin rajoittaa kemoterapiassa käytettävän annoksen suuruutta.²² Edenneen syövän hoidossa käytetään yleensä resektiota eli elimen poistoa ja tämän jälkeistä sädehoitoa. Tässä kuitenkin eloonjäämisen ja syövän uusiutumisen suhde on ollut huono. Käytössä on myös herkistettyä kemoterapiaa yhdistettynä sädehoidon kanssa. Tutkimuksissa on havaittu normaalikudoksen toipuvan ajan myötä säteilyn aiheuttamista vahingoista, vaikka siihen olisi kohdistettu toinen annos säteilyä (jopa kaksinkertainen normaalin kudoksen yleisestä säteilystä).⁷ Sädehoidon annokset ovat tavallisesti 60-70 Gy. Elektiivisiin eli valittavissa oleviin imusolmukealueisiin kohdistettu sädeannos on pienempi kuin makroskooppisiin

kasvaimiin kohdistettu sädetys. Hoitoa annetaan 1,8-2,0 Gy:n päiväannoksina. Sädehoitoa annetaan myös hyperfraktioituna kahtena annoksena päivässä.²³

Syöpäpotilaat joutuvat kohtaamaan monia elämänlaatua heikentäviä tekijöitä. Syöpähoidot aiheuttavat muita sairauksia ja ne puolestaan vaikeuttavat pitkäaikaisia hoitoja. Tärkeimpiä seikkoja, jotka auttavat vähentämään potilaiden kuolleisuutta ovat pään ja kaulan alueen syövän muodostumisen estäminen ja diagnoosin teko pre-malignaattisten leesioiden aikaina⁸ eli ennen kuin kasvain on muuttunut pahanlaatuiseksi²⁴.

Sädetettävässä kudoksessa pitää olla riittävä määrä happea, jotta syöpäsolujen DNA saadaan vahingoitettua ja siten syöpäsolut tuhottua. HNSCC syövät ovat tyypillisesti hypoksisia. Tämän vuoksi ne ovat suhteellisen vastustuskykyisiä säteilyn vaikutuksille. Potilailla on testattu hypoksisten solujen sädehoitoherkistäjiä kuten misonidatsolea ja etanidatsolea.⁷ Niiden hyöty on saavutettu vasta annoksilla, jotka ovat aiheuttaneet potilaille neurotoksisuutta. Herkistäjien soveltuvuutta testataan enenevissä määrin. Testattavina ovat mm. herkistäjät, jotka aktivoituvat hypoksiassa, kemoterapian herkistäjät sekä kasvutekijät, jotka nostavat hapen määrää hemoglobiinissa.⁷

Jo yli 50 vuotta sitten tiedostettiin, että hypoksiset kasvaimet eivät reagoi sädehoitoon samalla tavoin kuin muut syövät.²⁵ Ongelma johti kokeiluihin, joissa potilaat kävivät ylipaineistetussa happikammiossa sädehoidon aikana. Tämän menetelmän pyrkimyksenä oli saada vereen ja kasvaimiin runsaammin happea. Uudeksi ongelmaksi muodostui kuitenkin akuutin hypoksian ilmeneminen. Yllä mainittujen lisäksi hoidon tehokkuuteen vaikuttavat solujen ja kudosten sisäinen sädeherkkyys ionisoivalle säteilylle, kasvaimen koko, sijainti sekä histologia. Sisäiseen sädeherkyyteen uskotaan vaikuttavan kudosspesifisten geenien ilmentyminen, sillä erityyppiset kasvaimet vaativat sädehoidossa erilaisia annoksia.²⁷ Sädeherkkyys vaihtelee ihmisten²⁸, mutta myös eri yksilöiden samaa alkuperää olevien tuumoreiden välillä²⁷.

Ionisoivan säteilyn etuna kliinisessä käytössä pidetään sen kykyä tunkeutua syvälle kudoksiin. Säteilyn aiheuttamia erilaisia DNA vaurioita ovat emäksien

häviäminen tai lisääntyminen tai DNA:n emäsjärjestyksen muutos. Soluja säteilytettäessä DNA-juosteeseen syntyy katkoksia, joista osan solu kykenee korjaamaan mm. käyttämällä vastakkaista juostetta templaattina. Tärkein syy ionisoivan säteilyn sytotoksisiin vaikutuksiin katsotaan olevan DNA kaksoisketjun katkokset niin, ettei se voi toimia uuden DNA-molekyylin templaattina. Jos säteily on aiheuttanut solussa sellaisen pysyvän vaurion, jota solu ei kykene korjaamaan tai se korjautuu kriittisellä tavalla virheellisesti, seurauksena voi olla solukuolema tai solun jakautumisen estyminen. On myös mahdollista, että suuret säteilyannokset aiheuttavat vakavan vaurion solukalvoon, joka tappaa solun. Kliininen vaste ilmenee kasvaimen pienenemisenä tai häviämisenä. Kudosten vasteeseen vaikuttavat solujen sisäiset ominaisuudet, soluihin kohdistuvat ulkoiset vaikutukset sekä solujen keskinäiset viestit.²⁷

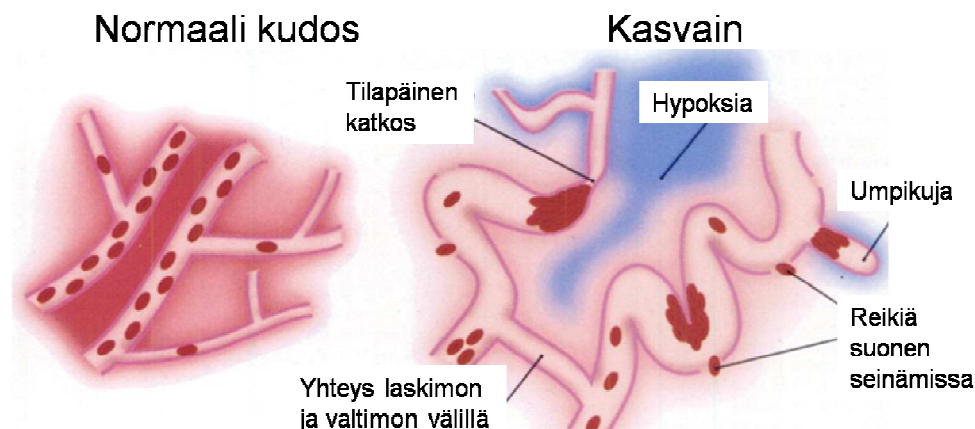
1.4 Kasvaimen mikroympäristö

Syöpäkasvain ei pysty kasvamaan vajaata millimetriä suuremmaksi ilman verisuonia²⁷. Kasvunsa mahdollistamiseksi kasvaimen on siis luotava oma verisuoniverkosto saadakseen happea, glukoosia ja muita ravintoaineita²⁹. Yksi syövän tuntomerkki onkin rakenteellisesti ja fysiologisesti epänormaalit verisuonet. Tämän verisuonten epänormaalin kasvun aiheuttaa kasvaimen omien preangiogeneettisten tekijöiden, kuten verisuonikasvutekijä VEGF:n, transformoivien kasvutekijöiden TGF- α ja - β :n, tuumorinekroosifaktori TNF- α :n ja interleukiini 8:n yliekspressio²³.

1.4.1 Angiogeneesi

Angiogeneesi eli verisuonien muodostuminen eroaa normaalin kudoksen ja kasvaimen välillä. Näitä eroja on havainnollistettu kuvassa 4 (kuva muokattu²⁶, J. Sinkkonen) Kasvaimen kaoottisesti muodostuneet ja kaukana toisistaan olevat verisuonet ovat usein mutkittelevia ja laajentuneita. Kasvainten verisuonille on tyypillistä myös vuotavat seinämät ja verisuonten päättymisen. Kasvaimissa on myös verisuonia, jotka yhdistävät laskimoita ja valtimoita ilman

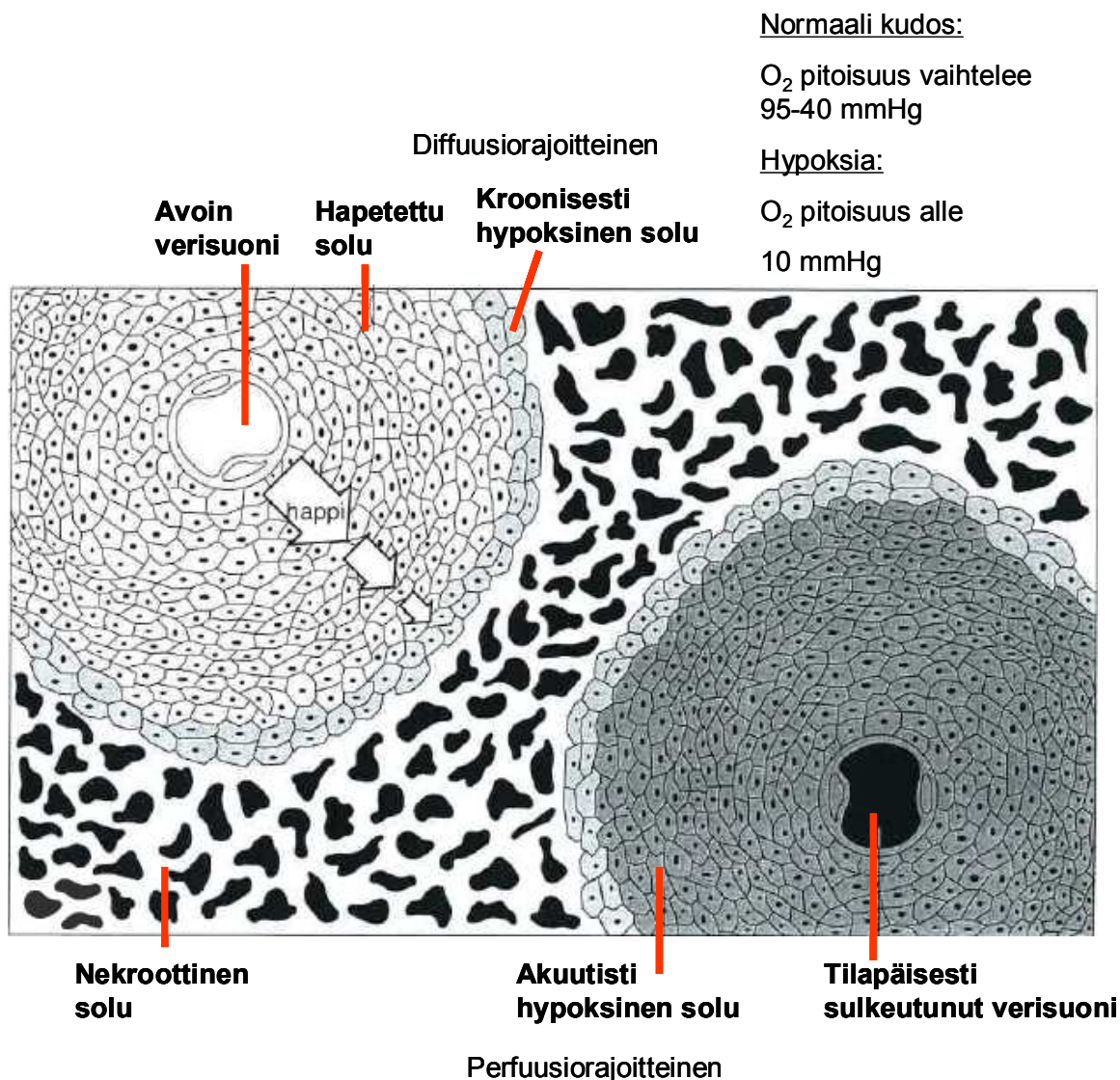
kaasunvaihtoa. Koska kasvaimen verisuonitus on epänormaali, sen sisäinen mikroympäristö vaihtelee muun muassa hapen osapaineen ja glukoosiaineenvaihdunnan suhteen.²⁶



Kuva 4 Normaalin kudoksen ja kasvaimen verisuonistot

1.4.2 Hypoksia kasvaimessa

Hapen osapaine vaihtelee normaalissa kudoksessa 40-95 mmHg välillä riippuen kudoksen metabolisesta aktiivisuudesta. Tämän vuoksi hypoksian määritelmä saattaa vaihdella eri kudoksissa. Kasvaimet luokitellaan yleensä hypoksisisiksi, kun niiden hapen osapaine laskee alle 10 mmHg³⁰. Kasvaimissa esiintyy kahdenlaista hypoksiaa, heikosta perfuusiosta johtuvaa akuuttia hypoksiaa ja heikosta diffuusiosta johtuvaa kroonista hypoksiaa (kuva 5 kuva muokattu³¹). Akuuttia hypoksiaa aiheuttavat verisuonten väliaikaiset tukkeutumat, kuten mikroveritulpat ja ahtaumien aiheuttamat tukkeutumat. Kroonista hypoksiaa esiintyy soluissa, jotka ovat 100-200 µm päässä happea kuljettavista verisuonista. Nämä solut muodostavat hypoksisen alueen normaali happipitoisuuden ja nekroottisten solujen välille (kuva 5).³²



Kuva 5 Akuutti ja krooninen hypoksia kasvaimessa

Niukka ravintoaineiden saanti mahdollistaa sen, että hypoksiset solut pysyvät hengissä. Se ei kuitenkaan mahdollista solujen kasvua tai muita monimutkaisia toimintoja. Vähähappinen ympäristö pitää yllä näitä kestäviä solufenotyyppiejä, joilla on vähemmän ravintoon liittyviä vaatimuksia. Ne eivät myöskään reagoi herkästi solunulkoisen pH:n tai hapen osapaineen muutoksiin.^{22,26,32}

Hapenpuutteesta kärsivät hypoksiset solut aiheuttavat ongelmia sädehoidossa, sillä tehokkaan sädehoidon vasteeseen tarvittavien happiradikaalien muodostuminen syöpäkudoksessa on estynyt³². Hypoksisilla kasvaimilla on yleensä myös suurempi vastustuskyky kemoterapeuttisille aineille, sillä

hypoksia estää solunjakautumista ja siten myös monien syöpälääkkeiden tehoa²². Tämän lisäksi hypoksiset solut sijaitsevat kauempana lääkeaineita kuljettavista verisuonista^{22,33}. On todettu, että hypoksia on merkki aggressiivisesta syövästä³⁴ ja hypoksian ilmeneminen kasvaimessa yhdistetään huonoon eloonjäämisennusteeseen^{30, 35}.

2 KÄYTETYT SOLULINJAT JA MENETELMÄT

2.1 Työssä käytetyt solulinjat

Käytin opinnäytetyössäni viidestä eri pään ja kaulan alueen syöpäpotilaasta eristettyjä levyepiteelisyövästä peräisin olevia syöpäsoluja. Käyttämäni solulinjat on listattuna taulukossa 3 UT-SCC solulinjat. Taulukossa on esitettyä solulinjojen nimet, potilaan sukupuoli ja ikä, kasvaimen ja solulinjan alkuperä sekä kasvainten luokitus (katso TNM luokitus ja kasvainluokat taulukosta 1 Pään ja kaulan alueen syöpien TNM luokitus). UT-SCC solukokoelma on perustettu Varsinais-Suomen sairaanhoitopiiriin eettisen toimikunnan luvalla ja sitä hallinnoi professori Reidar Grénman (Korva-, nenä- ja kurkkutautien klinikka, TYKS). Tutkimukseen valitut solulinjat ovat HNSCC-potilaista, jotka ovat hoidon suunnitteluvaiheessa käyneet PET-keskuksessa [¹⁸F]FDG-kuvauksissa. Solulinjojen nimessä olevat U ja T tulee sanoista University of Turku ja SCC kuvaa syöpäkudosta, josta solut on eristetty eli levyepiteelisyöpää, squamous cell carcinoma. Tilastollisessa valossa käytetty solulinjamäärä ei ole suuri, näin ollen tulokset eivät ole tilastollisesti vertailukelpoisia.

Taulukko 2 UT-SCC solulinjat

Solulinjan nimi	Sukupuoli	Potilaan ikä	Primääri tuumorin sijainti	TNM luokitus	Kasvain luokka	Ala-ryhmä	Näytepaikka	Leesio
UT-SCC-8	M	42	Ääniraon yläpuolinen kurkunpää	T2N0M0	G1	Kurkunpää	Kurkunpää	Primääri
UT-SCC-25	M	50	Kieli	T2N0M0	G1	Suuontelo	Kieli	Uusiutunut
UT-SCC-70	M	72	Alanielu	T4N1M0	G3	Suunielu	Alanielu	Primääri
UT-SCC-72	M	50	Alaleuan ien	T4N2M0	G2	Suuontelo	Ien	Primääri
UT-SCC-74	M	31	Kieli	T3N1M0	G1-G3	Suuontelo	Kieli	Primääri

Tutkimuksessa käytetyt solulinjat voidaan jakaa kolmeen alaryhmään sen mukaan mistä ne on eristetty. Käytetyt solulinjat on eristetty suuontelosta, suunielusta ja kurkunpäästä (Taulukko 2). Solulinjat ovat peräisin 31-72 vuotiaista miespotilaista. Alkuperäisten kasvainten koot vaihtelivat potilailla T2 ja T4 välillä. Kolmella potilaalla (linjat UT-SCC-70, -72 ja -74) esiintyi N1-N2

kokoluokan etäpesäkkeitä imusolmukkeissa. Muilla potilailla ei ollut etäpesäkkeitä. Tuumoriluokka (G) vaihteli G1:stä G3:een. Solulinjat UT-SCC-25:tä lukuun ottamatta on eristetty potilaiden primäärisyövästä. UT-SCC-25 solulinja on eristetty sädehoidon jälkeen uusiutuneesta syövästä.

2.2 Solujen viljely

Soluviljelyssä käytettyjen liuosten tiedot on esitetty liitteessä 2. Soluja kasvatettiin T-25 filtertikorkillisissa soluviljelypulloissa (25 cm²) 37 °C:ssa soluviljelykaapissa, jonka hiilidioksidipitoisuus oli 5 %. Solujen ravintoliuoksena käytettiin 1X D-MEM-kasvatusmediumia, johon lisättiin 10 % FBS, L-glutamiinia, penisiliiniä ja streptomysiiniä sekä tarvittavat aminohapot. Mediumin vaihtotiheys kasvatuspulloihin riippui solulinjasta, solulinjan kasvunopeudesta sekä fyysisesti havaittavasta kunnosta. Tyypillisesti medium vaihdettiin kaksi kertaa viikossa.

Kasvatukset harvennettiin solujen konfluenttiasteen ollessa 80–100 %. Solujen kyky sietää niiden irrotukseen käytettävää trypsiiniä vaihteli linjojen välillä. Käytettävän irrotusliuoksen määrä ja vaikutusaika riippui myös linjasta; solujen kunnosta ja kasvun konfluenttiasteesta. Koska solut olivat adherentteja, piti osaa solulinjoista trypsinoinnin lisäksi raaputtaa irti kasvatuspullon pohjasta soluraaputtimella. Irrotettu solumassa sentrifugoitiin 5 min 750 g (24–27 °C) minkä jälkeen muodostunut supernatantti kaadettiin pois ja pohjalle painunut solupelletti suspensoitiin uuteen kasvatusmediumiin.

Soluja pakastettiin myös myöhempää käyttöä varten. Ensiksi solut irrotettiin kuten edellä jakamisen yhteydessä. Solupelletti suspensoitiin kasvatusmediumilla cryo-putkeen ja sen päälle pipetoitiin jääkylmää 20% DMSO-pakastusmediumliuosta. Tämän jälkeen soluja sisältävä cryo-putki siirrettiin välittömästi jälle. Cryo-putket pakastettiin styroksirasiasissa -70 °C:ssa vähintään vuorokauden ajan, josta ne siirrettiin syväpakastimeen -135 – -150 °C:een.

Aloitettaessa solujen kasvattaminen pakasteesta otetut soluampullit sulatettiin kädessä. Sulanut, mutta hileinen solususpensio pipetoitiin lämpimään kasvatusmediumiin, jonka jälkeen solut kerättiin sentrifugoimalla (5 min, 550 g, 20–24 °C). Muodostunut solupelletti resuspensoitiin kasvatusmediumiin ja solususpensio jaettiin kahteen T-25 solukasvatuspulloon. Pullojen kasvatusmediumi vaihdettiin kahden päivän kuluttua uuteen, tuoreeseen mediumiin.

2.3 Kasvukäyrien valmistus normoksiassa

Soluja kasvatettiin ja pidettiin yllä luvussa 2.2 kuvatulla tavalla. Kun solut olivat saavuttaneet tasaisen jakautumissyklinsä, irrotettiin ne kasvatuspulloista ja jaettiin 6-kuoppalevyille kasvamaan. Irrotetut solut laskettiin ennen kuin ne pipetoitiin kuoppalevyille ja jokaiseen kuoppaan pipetoitiin laskennallisesti sama määrä soluja. Kuoppiin pipetoitavaan solumäärään vaikutti optimointi, joka perustui kunkin linjan tyypilliseen jakautumissykliin. Soluja kasvatettiin kuoppalevyillä seitsemästä yhdeksään vuorokautta, jonka aikana solujen lisääntymistä seurattiin laskemalla rinnakkaisten kuoppien solumäärät Bürkkerin solulaskukammioilla. Laskennassa otettiin huomioon kaikki solulaskukammion ruudut. Kasvukäyrästä määritettiin solulinjojen generaatioaika eli aika, jonka kuluessa solupopulaatio kaksinkertaistuu. Generaatioajan laskuesimerkki löytyy liitteestä 4.

2.4 Hypoksiakasvukäyrien valmistus

Kun solut olivat saavuttaneet tasaisen jakautumissyklinsä ne irrotettiin luvun 2.2 mukaan. Solulinjojen kasvunoupeuden optimoinnin avulla solut jaettiin pipetoimalla 6-kuoppalevyille kasvamaan niin, että laskennallisesti jokaisessa kuopassa oli sama määrä soluja. Soluja kasvatettiin normoksiassa muutaman vuorokauden ajan ennen kuin ne siirrettiin hypoksiakaappiin (1 % O₂, 37 °C) kasvamaan. Kuoppien kasvatusmediumi vaihdettiin samalla kun rinnakkaisista kuopista irrotettiin solut laskentaa varten. Irrotuksen jälkeen solut siirrettiin pois hypoksiakaapista. Tämän jälkeen solut fuugattiin ja laskettiin käyttäen Bürkerin

solulaskukammiota ja mikroskooppia. Lasku suoritettiin rinnakkaisista kuopista niin, että kaikki kammion ruudut otettiin huomioon.

2.5 Säderesistenssimäärittelyn periaate

Solujen herkkyyttä ionisoivalle säteilylle tutkitaan säderesistenssimäärittelyllä. Soluja, jotka kykenevät sädetyksestä huolimatta jakautumaan loputtomiin ja muodostamaan kolonneja kutsutaan klonogeenisiksi soluiksi. Sädeherkkyyttä voidaan kuvata solujen eloonjäämiskäyrällä. Solujen eloonjäännillä tarkoitetaan solujen kykyä jakautua sädetyksestä riippumatta. Sädetyksestä aiheutuneen vaurion takia solu saattaa menettää jakautumiskykynsä toistuvasti tai loputtomasti vaikka sen aineenvaihdunta, proteiini- ja DNA-synteesi jatkuisivatkin. Solu saattaa jopa kyetä muutamaa mitoosiin ennen hajoamistaan. Eloonjäämiskäyrä kuvaa klonogeenisten solujen suhteellista osuutta eri sädeannoksilla. Eloonjäämiskäyrän alle jäävä pinta-ala (AUC) kuvaa solulinjan sisäistä sädeherkkyyttä.²⁷ Vaikka varsinainen eloonjäämiskäyrän kuvaaja alkaa ensimmäisestä sädeannoksesta, AUC arvo lasketaan sädeannoksesta nolla alkaen. Opinnäytetyössä käytettiin analyysiä, joka perustui solujen kykyyn jakautua kolonneiksi sädeherkistyksen jälkeen. Absorboituneen säteilyannoksen yksikkö on SI-järjestelmän mukainen Gray (Gy).

Kyseisellä säderesistenssimäärittelyllä on ollut merkittävä rooli radiobiologiassa. Vaikka alun perin analyysiä on käytetty määrittämään sädetyksen vaikutusta soluihin, nykyään analyysiä käytetään myös tutkittaessa eri aineiden vaikutuksia käytännön sovelluksissa. Ionisoivan säteilyn vaikutusten lisäksi tutkimuskohteena ovat muun muassa solunsalpaajat kuten etoposidin ja sisplatiini, antiangiogeeniset molekyylit kuten endostatiini ja angiostatiini sekä sytokiinit ja niiden reseptorit. Näiden molekyylien vaikutuksia tutkitaan joko yksittäin tai yhdistelmähoitoina.³⁶

2.5.1 Säderesistenssin määrittäminen

Soluja kasvatettiin ja pidettiin yllä luvussa 2.2 esitetyllä tavalla. Ennen säderesistenssianalyysin aloittamista oli varmistettava, että solut olivat elinvoimaisia ja hyväkuntoisia, ja että solulinja oli saavuttanut sille tyypillisen jakautumissyklin. Solujen karakterisointi ja kunnon seuranta tehtiin tarkkailemalla soluja päivittäin mikroskoopilla. Kun edellä mainitut kriteerit täyttyivät ja solujen konfluenttiasite T-25 solukasvatuspullossa oli noin 60 %, solut irrotettiin, resuspensoitiin Ham's F-12 mediumiin, joka sisälsi 15 % FBS seerumia, ja laskettiin.

Sädetyksessä käytettiin kuutta eri sädetysannosta. Kutakin annosta varten valmisteltiin oma soluja sisältävä Falcon-putki. Putket sisälsivät eri määrän soluja. Välittömästi sädetyksen jälkeen solut pipetoitiin 96-kuoppalevyille, suojattiin kevyesti pakastepussilla ja jätettiin kasvatuskaappiin kasvamaan 37 °C:een kolmeksi viikoksi. Jokaista sädeannosta kohden valmistettiin kaksi kuoppalevyä. Solun jakautumissyklin perusteella päätettiin, että kontrollina toimivalle kuoppalevyille pipetoidaan laskennallisesti kolme solua per kuoppa.

Seuraavaksi laskettiin alla olevalla kaavalla, kuinka paljon alkuperäistä eli irrotetuista soluista saatua solususpensiota tuli pipetoida 2. solususpensioon, jotta sen lopputilavuudeksi mediumin kanssa saatiin 2,5 ml ja lopulta kuoppiin taulukossa 4 osoitetut solumäärät.

$$\frac{4162 \times \left(\frac{\text{kontrollikuopan solumäärä}}{2} \right) \times (2. \text{solususpensio}) \text{ ml}}{(\text{alkuperäinen solususpensio}) \text{ s/ml}} = (\text{alkuperäinen solususpensio}) \text{ ml}$$

Esimerkkilasku UT-SCC-70 solulinjasta:

Irrotettuja soluja oli 756 667 s / ml

Kontrollikuopan solumääräksi haluttiin 3 solua / kuoppa

2. solususpension lopputilavuudeksi haluttiin 2,5 ml

$$\frac{4162 \times \left(\frac{3}{2}\right) \times (2,5) \text{ ml}}{(756\ 667) \text{ s/ml}} \approx 0,02065 \text{ ml} \approx 20 \mu\text{l}$$

näin ollen 2. solususpensio koostui 20 µl:sta alkuperäistä T-25 kasvatuspullosta irrotettua ja resuspensoitua solususpensiota ja 2480 µl:sta mediumia. Solut sädetettiin Falcon putkissa, joista jokainen sisälsi 50 ml mediumia ja soluja sädeannoksesta riippuen. Taulukossa 3 on havainnollistettuna mediumiin 2.solususpensiosta pipetoitava tilavuus ja kuoppiin laskennallisesti pipetoitavat solumäärät sekä sädeannokset. Edellä laskettu lasku mahdollisti sen, että pipetoitaessa 200 µl sädetetystä Falcon-putkesta 96-kuoppalevyn kuoppaan, saatiin kuoppaan taulukon 3 mukainen solumäärä. Sädetystä seuranneen kolmen viikon inkuboinnin jälkeen kuoppalevyt analysoitiin. Positiivisesi kuopaksi luokiteltiin kuopat, joihin oli muodostunut vähintään 32 solun kolonnin. Säderesistenssimäärittäminen on havainnollistettu liitteessä 3.

Taulukko 3 Säderesistenttimäärittäksen 96-kuoppalevyjen valmistus

Sädeannos (Gy)	Solua/Kuoppa	2.Solususpensio (ml)
0	3	120
0,75	3	120
1,25	6	240
2,5	6	240
5	12	480
7,5	12	480

2. solususpensiosta pipetoitava tilavuus tuplaantuu joka toiselle sädetysannokselle. 2. solususpension määrä ei muutu vaikka sädetysannokselle ominainen solumäärä muuttuisi. Kontrollikuoppien solumäärä on solulinjariippuvainen.

Putkia tuli ravistella voimakkaasti koko ajan ennen sädetystä, jotta solut eivät päässet agglomeroitumaan vaan pysyivät yksisolususpensiona. Falcon-putket asetettiin sädetuksen ajaksi kuvassa 6 olevaan pleksifantomiin niin, että soluputkien keskikohta oli 2 cm etäisyydellä fantomin pinnasta säteilykentän suunnassa. Sädetyksessä käytettiin lineaarikiihdyttimellä synnitettyä fotonisäteilyä. Jarrutussäteily eli sädetyksessä käytettyä fotonisäteilyä syntyi kun elektroneja kiihdytettiin lineaarikiihdyttimellä haluttuun energiaan ja törmäytettiin kohtioon.³⁷



Kuva 6 Sädetyksessä käytetty pleksifantomi

Putket asetettiin fantomiin sädetuksen ajaksi. Sädetys kesti annosmäärästä riippuen muutamia minuutteja. Homogeenisen yksisolususpension varmistamiseksi 5,0 ja 7,5 Gy:n sädetysnoksien puolella välissä pidettiin tauko, jonka aikana putkia käytiin ravistamassa. Ravistelulla estettiin solujen painuminen pohjaan ja näin parannettiin todenäköisyyttä, että jokainen solu altistui sädetykselle. Alla on listattuna pleksifantomien tiedot sekä täsmätietoa käytetystä sädetyksestä³⁷.

Pleksifantomien tiedot:

- leveys 40 cm, korkeus 12 cm, syvyys 10 cm

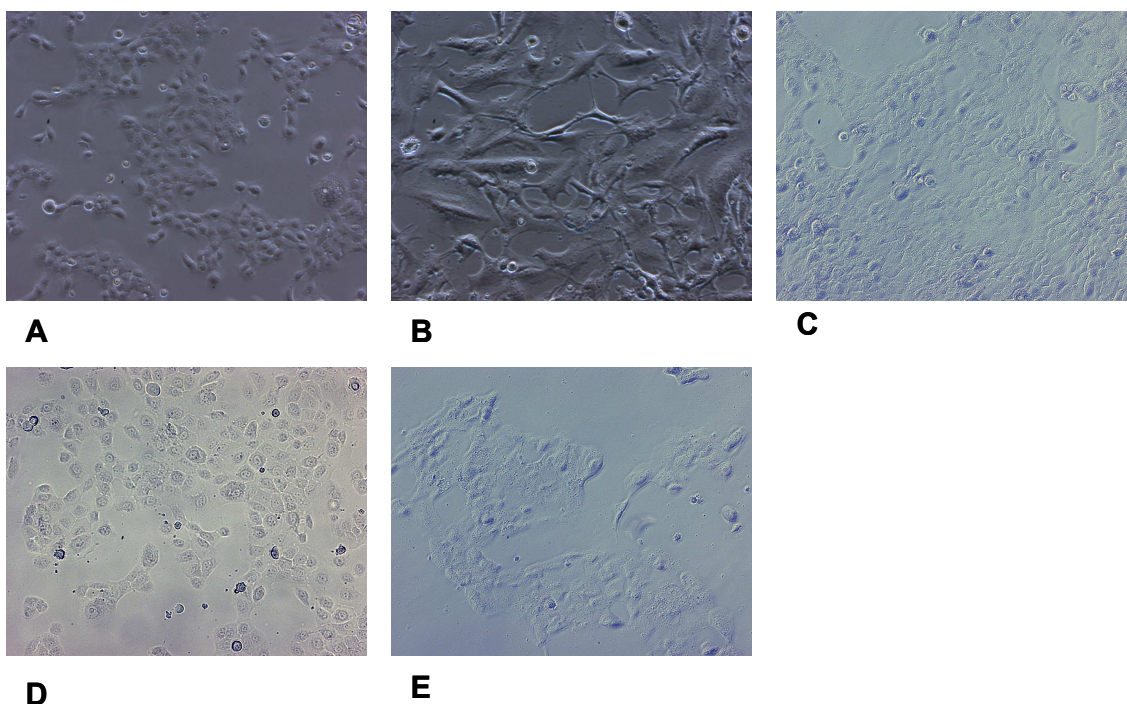
Säteilytyksen tiedot:

- Fotonien energian kiihdytysjännite: 6 MV
- Pleksifantomien etäisyys säteilylähteestä eli kohtiosta: 100 cm (soluputkien keskikohta 102 cm etäisyydellä säteilylähteestä)
- Säteilykentän koko 100 cm:n etäisyydellä säteilylähteestä: 40 cm x 20 cm
- Annosnopeus putkissa: 3 Gy/min

3 TULOKSET

3.1 Solulinjojen morfologiasta ja kasvutavoista

UT-SCC solut poikkesivat toisistaan huomattavasti niin morfologialtaan kuin kasvutavoiltaan. Kuvassa 7 Tutkimuksessa käytettyjen solujen morfologia, on kuvattuna jokainen tutkimuksessa käytetty solulinja.



Kuva 7 Tutkimuksessa käytettyjen solujen morfologia

Kuvassa A) on UT-SCC-8 linjan soluja (kurkunpää). B) UT-SCC-25 linjan solujen (kieli) morfologia erosi eniten muista solulinjoista. Kuvassa C) UT-SCC-70 linjan soluja (alanelu) ja kuvassa D) on UT-SCC-72 soluja (ien). E) UT-SCC-74 linjan solujen (kieli) koko vaihteli. Kuvat on otettu Olympus IX70-mikroskoopilla 10X objektiivilla ja tarkasteltu Analysis –ohjelmalla.

UT-SCC –solulinjojen kasvutavat ja morfologiat on kuvattuna taulukossa 4 UT-SCC –solulinjojen kasvutavat ja morfologiat. Mitä enemmän taulukon

sarakkeessa on + -merkkejä sitä enemmän solulinja ilmentää otsakkeen ominaisuutta.

Taulukko 4 UT-SCC -solulinjojen kasvutavat ja morfologiat

Solulinja	Kasvutapa	Koko	Muoto	Kasvu- nopeus	Adherenttisuus	Trypsiinin- sieto
UT-SCC-8	yksisolukerros	+	pyöreä	++	+++	+++
	päällekkäistä laajaa		moni-			
UT-SCC-25	soluverkosta	+++	haarainen	+	+	+
	osittain monisolukerros; ylöspäin muodostuvia					
UT-SCC-70	solujonoja	++	pyöreä	+	+	+
UT-SCC-72	yksisolukerros	+	pyöreä	+++	+++	++
UT-SCC-74	yksisolukerros	++	pyöreä	++	++	++

Kaikissa solulinjoissa pienemmän passagen (<10) solut kasvoivat hitaammin ja olivat haasteellisempia pitää yllä kuin suuremman passagen solut (kuva 8). Etenkin pienen passagen solujen viljelyn aloittaminen ja kasvattaminen ensimmäisten harvestointien ja jakojen jälkeen oli hankalaa. Näiden solujen jakautuminen oli erittäin hidasta ja tasaisen jakautumissyklin saavuttaminen vei huomattavasti aikaa. Tämän vuoksi edustavia soluja oli haasteellista saada suuria määriä tutkimuksia varten. Solulinjasta riippuen solut kasvoivat joko yksisolu- tai monisolukerroksena. Kaiken kaikkiaan ongelmana UT-SCC solujen ylläpidossa oli solujen herkkyys trypsiinikäsittelyyn, raaputtamiselle, kasvatusmediumin vaihtotiheyteen ja liian tiheään kasvattamiseen, mutta myös liian usein jakamiseen.

Esimerkiksi UT-SCC-8 oli yksisolukerroksena kasvava hyvin adherentti eli tiukasti kasvualustassaan kiinni kasvava linja. Tämä linjan solut kiinnittyivät nopeasti alustaansa ja saavuttivat melko nopeasti linjalle ominaisen kasvuvauhdin pakastuksen jälkeen. Solujen harventaminen (1:2 tai 1:3) tapahtui noin kerran viikossa. UT-SCC-8 solut eivät olleet kovin herkkiä kasvuolosuhteistaan vaan kestivät jopa 100%:sen konfluenttiasteen ja irtosivat trypsiinikäsittelyssä 4-5 minuutin lämpöinkubaatiolla. Solut kestivät hyvin myös raaputtamista soluraaputtimella trypsiinikäsittelyn loppuvaiheessa.

Raaputtamalla kevyesti viljelypullon pohjaa saatiin seuraavaan siirrostukseen huomattavasti suurempi määrä soluja kuin ilman raaputtamista. Linjan soluja oli helppo kasvattaa myös suuremmassa T-75 solukasvatuspullossa. Morfologialtaan UT-SCC-8 linjan solut olivat säännöllisiä, pieniä ja pyöreitä.

UT-SCC solulinjakokoelman linjat sisältävät potilaan kasvaimen eri kohdista eristettyjä soluja. Kasvaimen eri ympäristöistä eristetyt solut erosivat toisistaan sekä morfologialtaan että kasvutavoiltaan. Koska solujen kasvutavat poikkesivat saman linjan sisällä, optimaalisten kasvuolosuhteiden löytäminen oli yhä haasteellisempaa. Taulukossa 5 on esitetty normoksiassa kasvatettujen solujen generaatioajat.

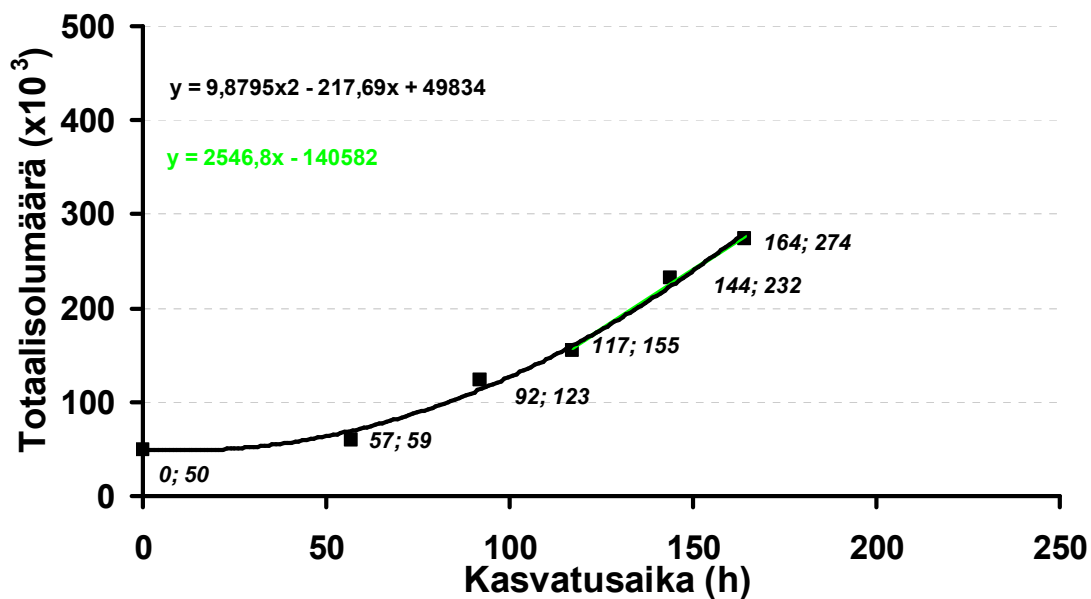
3.2 Normoksiakasvukäyrät

Kasvukäyräkuvaajissa puolipiste jakaa hetken jolloin solut on irrotettu ja solumäärän ko. hetkenä. Aikaväli, josta generaatioaika on määritetty, on kuvattu kasvukäyriin vihreällä suoralla.

Taulukko 5 Solujen generaatioajat normoksia-olosuhteissa

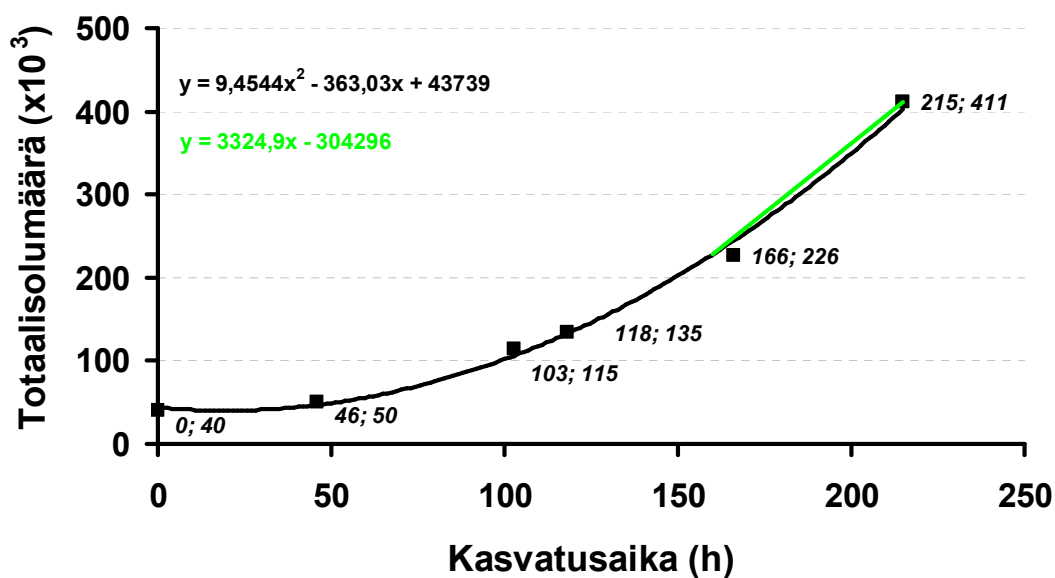
Solulinjan nimi ja passage (p)	Primaari tuumorin sijainti	Generaatioaika (h)
UT-SCC-8 p30	Ääniraon yläpuolinen kurkunpää	57
UT-SCC-25 p5	Kieli	65
UT-SCC-70 p24	Alanielu	66
UT-SCC-72 p17	Alaleuan ien	46
UT-SCC-74 p37	Kieli	59

UT-SCC-8 (p30)



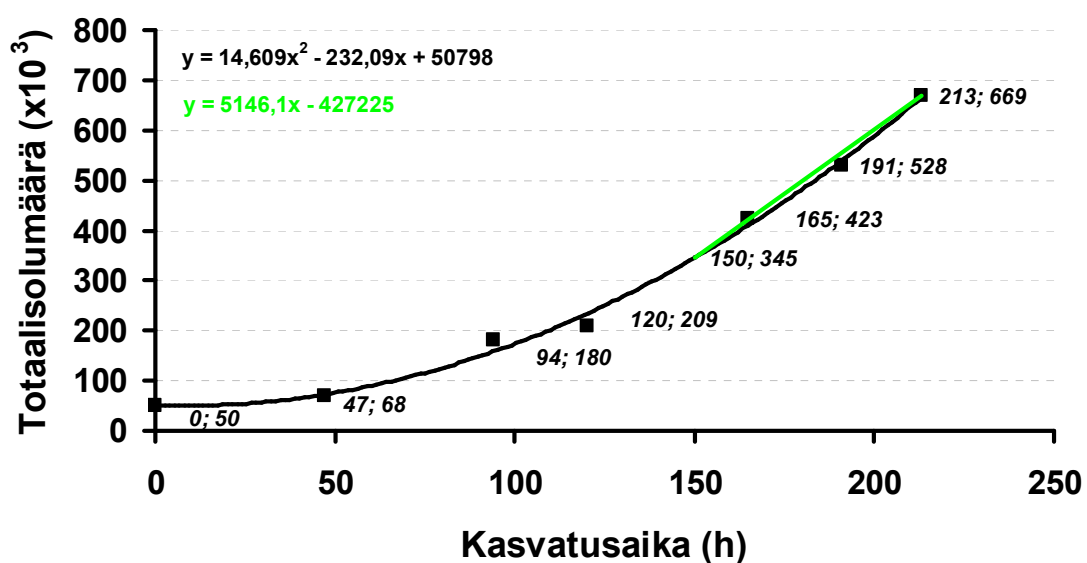
Kuva 8 UT-SCC-8 p 30 normoksiakasvukäyrä

UT-SCC-25 (p5)



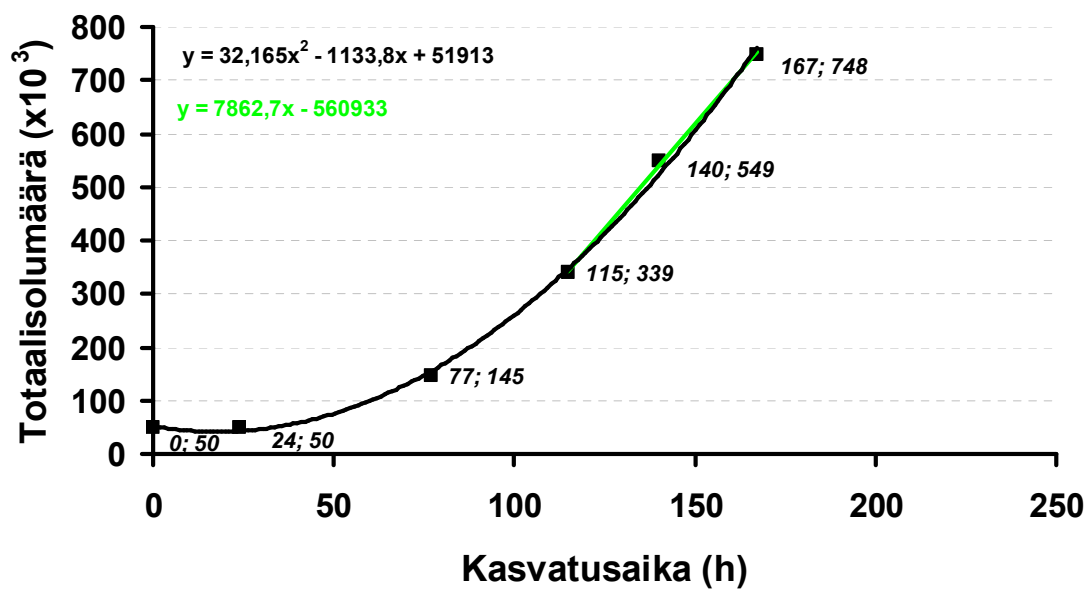
Kuva 9 UT-SCC-25 p 5 normoksiakasvukäyrä

UT-SCC-70 (p24)

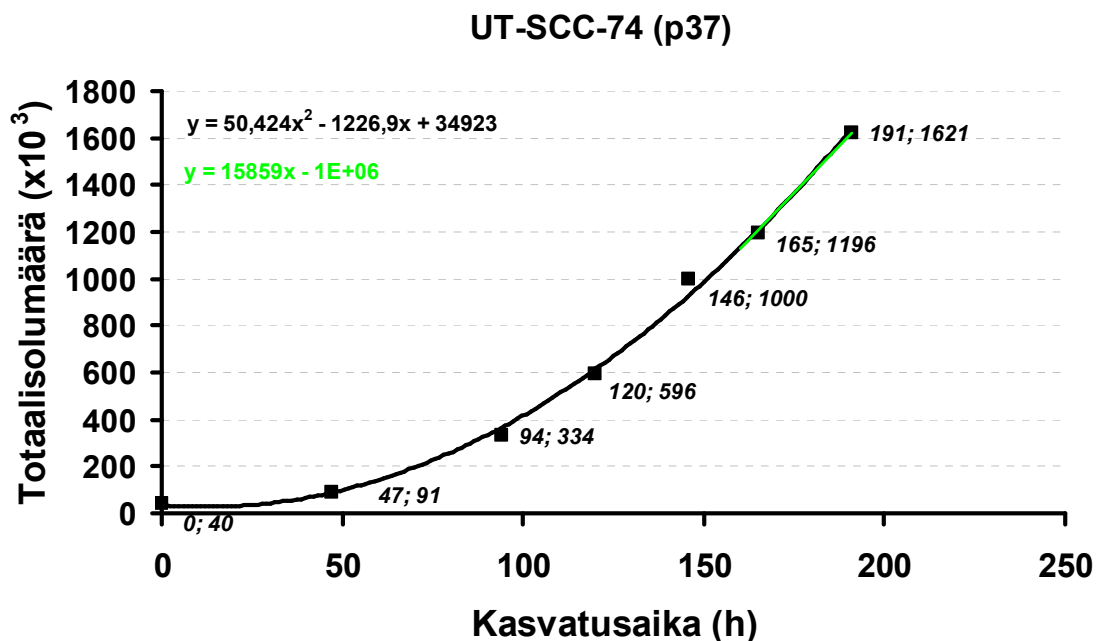


Kuva 10 UT-SCC-70 p 24 normoksiakasvukäyrä

UT-SCC-72 (p17)



Kuva 11 UT-SCC-72 p 17 normoksiakasvukäyrä

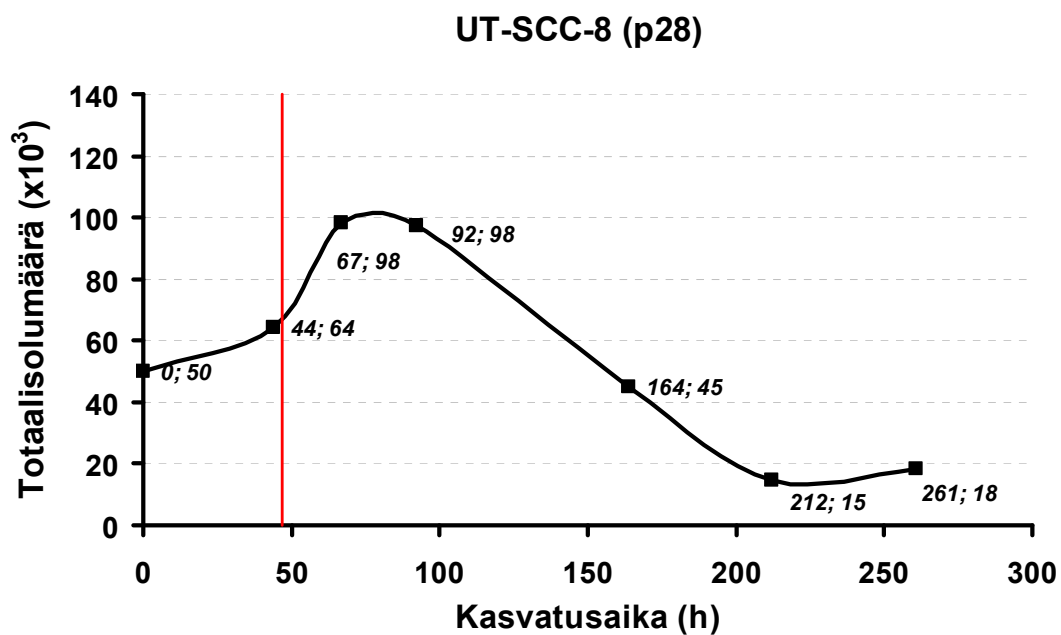


Kuva 12 UT-SCC-74 p 37 normoksiakasvukäyrä

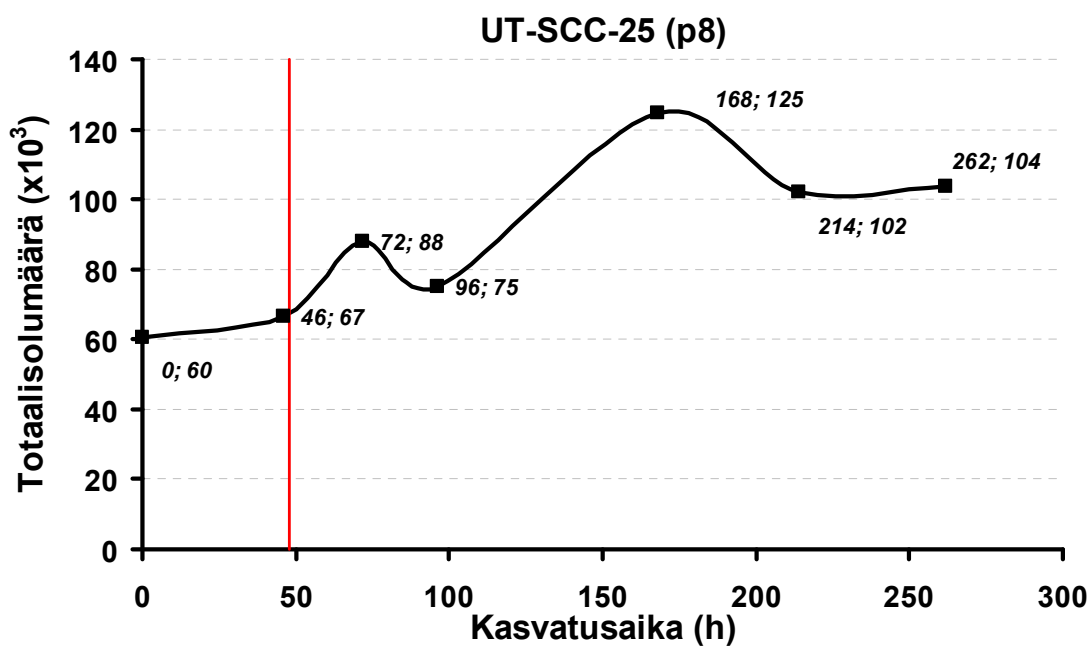
Kasvukäyräkuvaajat on esitetty myös puolilogaritmisessa asteikossa kts. liite 5.

3.3 Hypoksiakasvukäyrät

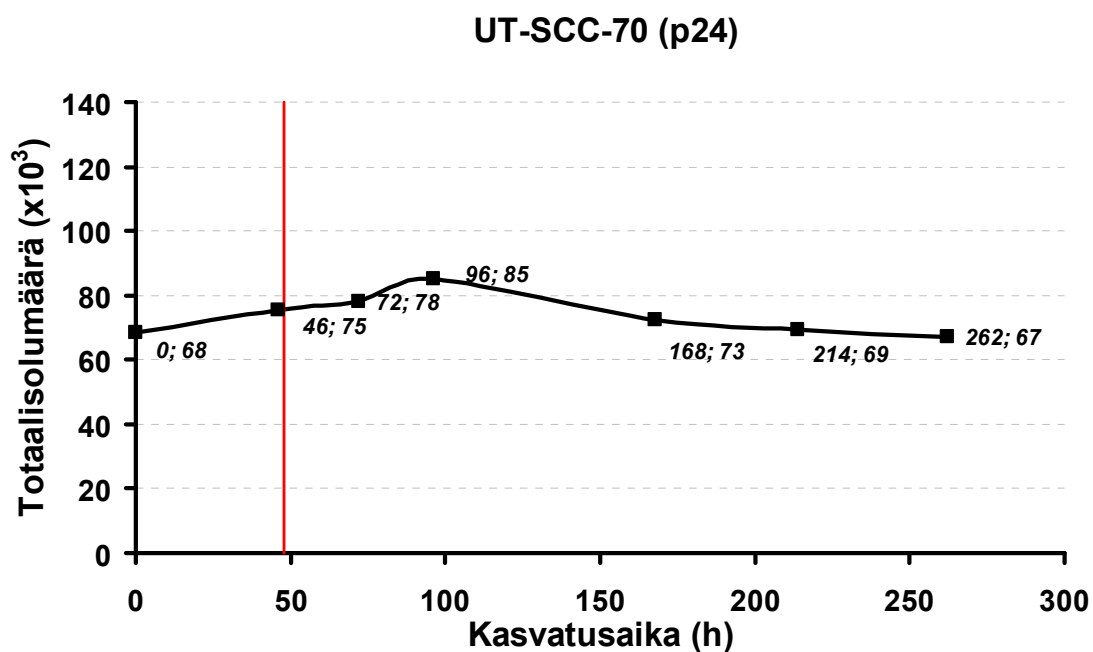
Hypoksiassa kasvatettujen solulinjojen kasvua on kuvattu alla olevilla kasvukäyrillä. Solulinjan nimen perään on merkitty käytetyn passagen (p) numero. Käyrä osoittaa solujen totaalimäärää ajan funktiona. Pystysuora punainen viiva osoittaa ajanhetkeä, jolloin solulinja on siirretty normoksiasta kasvamaan hypoksia-olosuhteisiin.



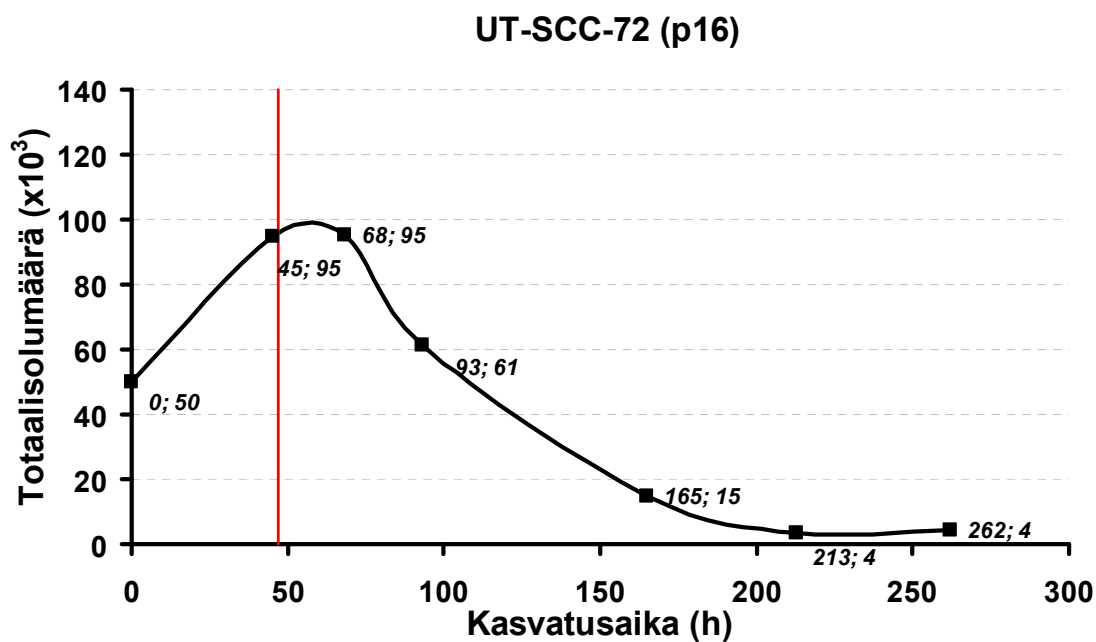
Kuva 13 UT-SCC-8 p 28 hypoksiakasvukäyrä



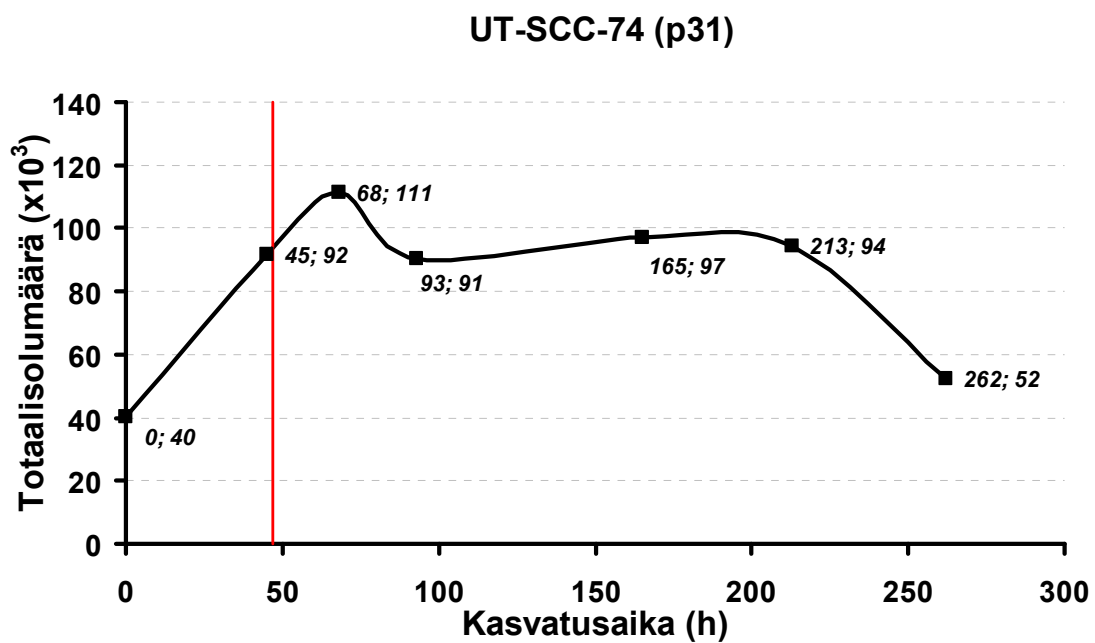
Kuva 14 UT-SCC-25 p 8 hypoksiakasvukäyrä



Kuva 15 UT-SCC-70 p 24 hypoksiakasvukäyrä



Kuva 16 UT-SCC-72 p 16 hypoksiakasvukäyrä



Kuva 17 UT-SCC-74 p 31 hypoksiakasvukäyrä

3.4 Säderesistenssimäärittäminen

Taulukko 6 UT-SCC-70 p17 –linjan selviytyminen sädetyksestä

Soluja/ kuoppa	Sädeannos (Gy)	Positiivisten kuoppien määrä/96		SF	
		määrittäminen 1	määrittäminen 2	1	2
3	0	71	72		
3	0,75	70	71	0,979	0,993
6	1,25	87	83	0,608	0,58
6	2,5	65	54	0,455	0,378
12	5	16	22	0,0559	0,0769
12	7,5	1	1	0,00349	0,00349

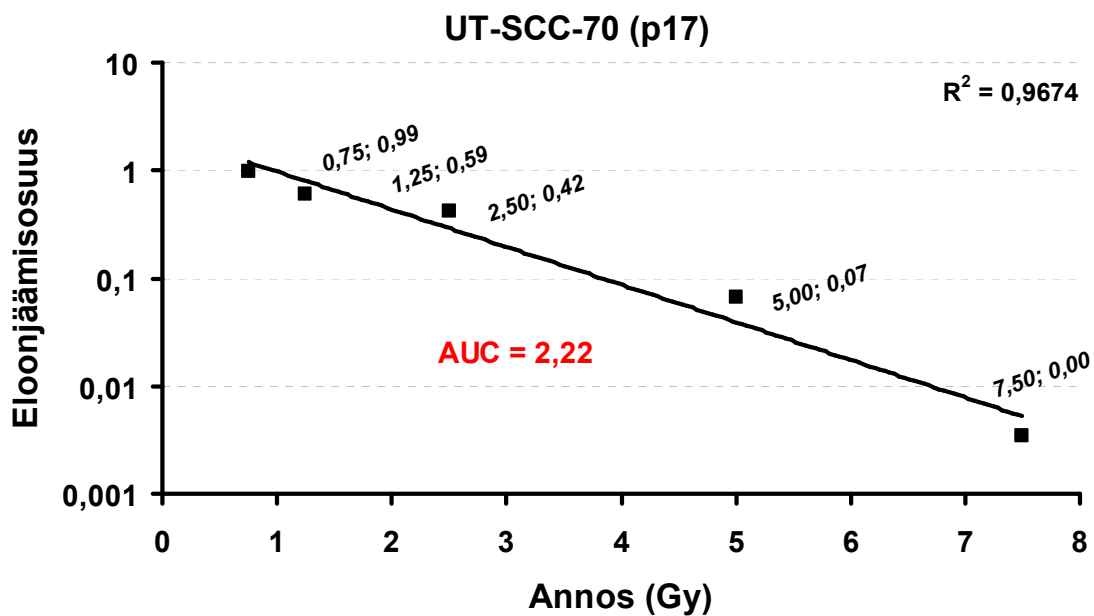
Kuoppa luokiteltiin positiiviseksi mikäli siinä kasvoi vähintään 32 solun kolonni.

Taulukko 7 UT-SCC-72 p20 –linjan selviytyminen sädetyksestä

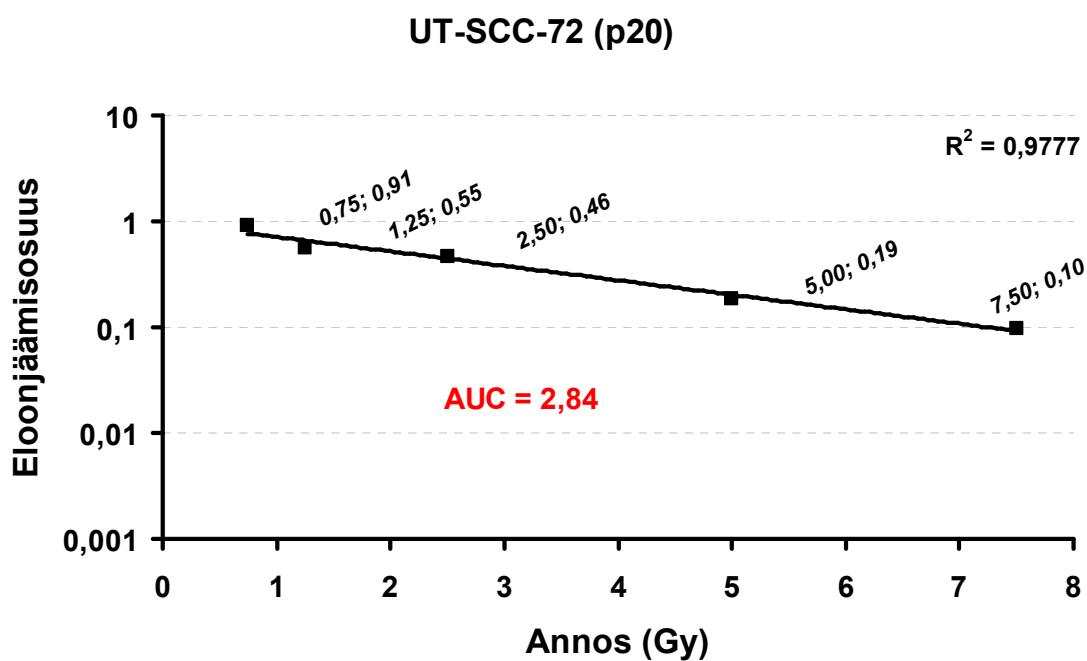
Soluja/ kuoppa	Sädeannos (Gy)	Positiivisten kuoppien määrä/96		SF	
		määrittäminen 1	määrittäminen 2	1	2
3	0	71	78		
3	0,75	67	69	0,899	0,926
6	1,25	82	82	0,55	0,55
6	2,5	71	66	0,476	0,443
12	5	57	54	0,1006	0,181
12	7,5	31	27	0,104	0,0906

Laskuesimerkki eloonjäämisosuuden (SF) laskemisesta kts. liite 4.

Eloonjäämiskäyrien kuvaajissa puolipiste jakaa soluihin kohdistetun sädeannoksen ja eloonjäämisosuuden.



Kuva 18 UT-SCC-70 p 17 eloonkäämiskäyrä



Kuva 19 UT-SCC-72 p 20 eloonjäämiskäyrä

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Solujen erot kasvutavoissa

Tutkimuksessaan Henriksson ym. (2009) onnistuivat tekemään vain kuuden HNSCC potilaan kasvaimesta jatkuvakasvatteiset solulinjat, vaikka heidän pyrkimyksensä oli saada aikaan 18 solulinjaa. Nämä kuusi onnistunutta HNSCC solulinjaa (LU-HNxSCC-3, -4, -5, -6, -7, -8) erosivat toisistaan kasvutavan ja -nopeuden suhteen. Myös niiden vasteet kasvatusolosuhteisiin erosivat toisistaan. TNM luokalla, syövän asteella (G) tai primäärikasvaimen sijainnilla ei havaittu olevan yhtäläisyyksiä eri solulinjojen kasvutapoihin³⁸. Henrikssonin ym. (2009) tutkimuksen tulokset sekä aikaisempi tutkimus UT-SCC solulinjoilla tukevat tässä opinnäytetyössä tehtyjä havaintoja kasvutapojen eroista.

Tutkimuksessaan Henriksson ym. (2009) vertailivat myös potilaiden eloonjäämisen yhtäläisyyttä heidän kasvaimistaan eristettyjen solulinjojen kasvuun. Potilaat, joiden kasvaimista onnistuttiin luomaan toimiva solulinja, elivät diagnoosin jälkeen keskimäärin kahdeksan kuukautta. Potilaat, joiden kasvaimesta ei onnistuttu luomaan solulinjaa, elivät huomattavasti kauemmin (78 kk diagnoosin jälkeen). Potilaat, joiden kasvaimista linjat UT-SCC-70, UT-SCC-72 ja UT-SCC-74 on eristetty, elivät keskimäärin seitsemän kuukautta diagnoosin jälkeen. Tämä viittaa siihen, että kasvaimet, joista saadaan kasvatettua jatkuvatoimisesti soluja *in vitro*, ovat pahanlaatuisempia verrattuna niihin kasvaimiin, joiden soluja ei onnistuta kasvattamaan *in vitro*. Potilas, jonka kasvaimesta linja UT-SCC-25 on peräisin on elänyt diagnoosin jälkeen vielä vuoden ja yhdeksän kuukautta. Tämän solulinjan solut on eristetty tumorista sädehoidon jälkeen. Potilaan, jonka kasvaimesta on eristetty UT-SCC-8 solulinja, elinikää diagnoosin jälkeen ei tiedetä.

Koska opinnäytetyössä käytetyt solulinjat eivät olleet kaupallisia linjoja niiden kasvattaminen oli toisinaan hyvin hankalaa. Etenkin pienten passagen solujen

viljelyn aloittaminen ja kasvattaminen ensimmäisten harvestointien ja jakojen jälkeen oli haasteellista. Solujen kasvu oli erittäin hidasta ja tasaisen jakautumissyklin saavuttaminen vei huomattavasti aikaa. Toisinaan myös kasvualustaansa kiinnittyminen vei soluilta aikaa ja joskus jaetuista soluista vain murto-osa kiinnittyi ja jatkoi kasvuaan. Tämän vuoksi edustavia soluja oli haasteellista saada suuria määriä kasvukäyrätutkimuksia varten. Esimerkiksi linjan UT-SCC-70 solut olivat herkkiä korkealle konfluenttasteelle. Jos soluja oli kasvatettu liian tiheäksi vei aikaa, että solujen kunto saatiin elpymään. Toisinaan tämän linjan solujen kasvattaminen oli hyvin hankalaa. Niiden trypsiinin sieto oli heikko. Linjan solut eivät olleet kovin adherentteja ja soluja esiintyi usein irtonaisina kasvatusmediumissa. Jos irtonaisia soluja oli runsaasti se viittasi usein siihen, että solut eivät voineet hyvin, jolloin niiden kasvukaan ei ollut optimaalista. Puolestaan linjan UT-SCC-72 solujen kasvuvauhtia oli vaikea ennustaa ja näin ollen solupullojen jaon suunnittelu tuotti ongelmia. Jakoa ei ollut hyvä suorittaa liian aikaisin eli konfluenttasteen ollessa alle 55 %, mutta koska linjan solujen kasvua oli vaikea ennustaa joskus solut kasvoivat hyvin tiheäksi ja jakoa ei kyennyt suorittamaan enää optimaalisella hetkellä eli konfluenttasteen ollessa noin 80%. Tämän linjan soluja esiintyi toisinaan myös irrallisena mediumissa.

4.2 Kasvukäyrät

Solujen kasvun optimointi oli merkittävää, ennen kasvukäyrien määrittämisen aloittamista. Kasvukäyränmäärittystä varten kuoppiin pipetoitava solumäärä riippui solulinjasta ja sen kasvunopeudesta. Osa linjoista vaati suuremman solukonsentraation saavuttaakseen nopeammin tyypillisen jakautumissyklinsä ja mahdollistaakseen kasvukäyrän onnistumisen. Jos taas solukonsentraatio oli alussa liian suuri, kuopan pinta-ala rajoitti solujen jakautumista määrittäyksen aikana. Solujen kunto vaikutti solujen kasvunopeuteen. Kasvukäyrissä käytettiin hyväkuntoisia soluja ja käyrien valmistus pyrittiin aloittamaan, kun solut olivat saavuttaneet pakastuksen ja siirrostuksen jälkeen niille ominaisen jakautumissyklinsä. Kasvukäyriin käytettävät solut irrotettiin solukasvatuspulloista, joiden konfluenttaste oli noin 80 %.

UT-SCC-8 linjan normoksiakasvykäyrä (kuva 8) tehtiin passagen 30 soluista ja hypoksiakäyrä (kuva 13) passagen 28 soluista. Sekä normoksia- että hypoksiakäyrien solut jakautuivat samalla syklillä ensimmäiset kaksi vuorokautta, joiden aikana molemmat käyrät olivat inkuboitumassa normoksiassa. Hypoksiakasvukäyrän aloittamisella normoksiassa varmistettiin solujen kiinnittyminen alustaansa ennen solujen siirtämistä hypoksiakaappiin.

Vuorokauden hypoksiassa olon jälkeen solut alkoivat reagoida happivajeeseen, jota seurasi tasainen kasvutrendi alaspäin joka tarkoittaa, että soluja kuoli suhteessa enemmän kuin uusia jakautui. Kuuden vuorokauden alaspäin jatkuvan trendin jälkeen hengissä selvinneet sitkeät solut alkoivat jakautua hitaasti muuttaen kasvutrendin positiiviseksi. Normoksiassa kasvu alkoi kahden vuorokauden jälkeen kiihtymään. Noin viiden vuorokauden jälkeen linja oli saavuttanut sille tyypillisen jakautumissyklinsä. Linjan solujen generaatioaika oli 57 tuntia. Linjan soluja oli helppo kasvattaa ja solujen kunnon määrittäminen oli helppoa. Tämän linjan kasvutapaa voisi kutsua melko tasaiseksi. Tämä voidaan havaita esimerkiksi siitä, että linjan solut eivät reagoineet välittömästi ympäristön muuttuviin olosuhteisiin ja vaikka linjan solut olivat suhteellisen adherentteja ne sietivät trypsiinikäsittelyä hyvin.

UT-SCC-25 linjan normoksiakasvukäyrän (kuva 9) kuoppiin pipetoitiin alatushetkellä noin 40 000 solua per kuoppa kun taas hypoksiakäyrän (kuva 14) kuoppiin pipetoitiin noin 60 000 solua per kuoppa. Vaikka molempien kasvukäyrien solut jakautuivat normoksiassa hitaasti kahden ensimmäisen vuorokauden aikana niin normoksiakäyrän solut jakautuivat hieman vilkkaampaa kuin hypoksiaan sirrettävän käyrän solut. Eräs syy tähän saattaa olla se, että pienemmän solukonsentraation kuopissa oli enemmän happea käytettävänä yhtä solua kohden kuin suuremman solukonsentraation kuopissa. Kahden vuorokauden hidastempoisen jakautumisen jälkeen linjojen jakautumisvauhti kiihtyi. Tämän mahdollisti solujen tottuminen uuteen kasvuympäristöön ja solujen kiinnittyminen kasvualustaansa. Kun linja siirrettiin hypoksiaan sen solut reagoivat heti happivajeeseen hidastamalla jakautumissykliään suhteessa normoksiakäyrän kiihtyneeseen

jakautumissykliin. Ensimmäisen hypoksia-olosuhteissa vietetyn vuorokauden aikana eli kolmannen vuorokauden aikana solujen jakamisesta kuoppalevyille, linjan solut lisääntyivät noin 16 % kun taas vastaavana aikana normoksiassa linjan solut jakautuivat 60 %. Tämän perusteella voidaan todeta linjalla olevan nopea reagointivaste ympäröiviin olosuhteisiin. Täytyy kuitenkin muistaa verrattaessa solujen jakautumista kolmannen vuorokauden aikana siirrostusajankohdasta, että prosentuaaliseen eroon vaikuttaa osaltaan myös se, että kuoppalevyjen kuoppien aloitussolukonsentraatiot eivät olleet samat. Näin ollen kasvuprosentteja ei voida suoraan verrata toisiinsa. Vuorokauden hypoksiassa olon jälkeen kasvutrendi muuttui laskevaksi. Kuitenkin vuorokauden kuluttua tästä eli kahden happivajeessa vietetyn vuorokauden jälkeen solulinjan kasvutrendi kääntyi jälleen positiiviseksi ja jatkui tasaisen nousevana noin kolmen vuorokauden ajan. Näiden kolmen vuorokauden jälkeen trendi jälleen kääntyi laskuun ja solumäärä alkoi laskea kunnes kahden vuorokauden kuluttua soluja alkoi jälleen jakautua enemmän suhteessa solukuolleisuuteen. Tämä positiivinen trendi oli kuitenkin hyvin loiva eli jakautumissykli oli hyvin hidas verrattuna solujen kuolleisuuteen. Normoksiassa linja saavutti tasasen jakautumissyklin reilun kuuden vuorokauden kasvattamisen jälkeen. Linja saavutti 65 tunnin generaatioajan aikavälillä 160 h – 215 h.

Hypoksiakäyrässä esiintyy sekä laskevaa että jälleen nousevaa ja laskevaa trendiä. Vaikuttaa siltä, että vaikka linja jakautuu hitaasti normoksisissakin olosuhteissa, linja on silti kasvultaan suhteellisen sitkeä. Hypoksiassa useaan otteeseen muuttuva trendi on osoitus siitä, että kun soluille ei riitä kylliksi happea ne alkavat kuolla. Solujen väheneminen mahdollistaa suuremman happipitoisuuden jäljelle jääneille sitkeille soluille ja ne alkavat jälleen jakautua, kunnes mediumiin liuenut happi on käytetty ja solut kohaavat jälleen hapen puutteen. Voimakkaaseen hapenpuutteeseen joutuminen johtuu siitä, että vaikka kaapin ilmasta on happea 1% niin liuenneen hapen osuus ei ole verrattavissa kaapin ilman happipitoisuuteen. Linjan sitkeyttä kuvaa myös se, että linja on eristetty sädetetystä tuumorista. Toisin sanoen linjan soluilla on korkea sädevaste, sillä ne eivät ole kuolleet sädehoidon aikana. Tämä taas on

osoitus hypoksisesta kasvaimesta, sillä hypoksia kasvattaa kudosten säderesistenttisuutta. UT-SCC-25 linjaa voidaan pitää sitkeyden lisäksi nopeasti ympäristön muutoksiin reagoivana. Linjan solut olivat heikosti adherentteja eli ne eivät kiinnittyneet voimakkaasti kasvualustaansa. Linjan solut olivat herkkiä trypsiinikäsittelylle.

Linjan UT-SCC-70 jakautumissykli oli hyvin samanlainen normoksiassa (kuva 10) kuin linjan UT-SCC-25 eikä linjojen generaatioajoissa ollut suurta eroa. UT-SCC-70 linjan solupopulaatio kaksinkertaistui 66 tunnissa (150 h eteenpäin määrityksen loppuun). Kolmannen ja neljännen vuorokauden aikana normoksiassa olleet solut jakautuivat 160 % kun taas hypoksiassa vastaavana aikana eli kahden ensimmäisen hypoksiassa vietetyn vuorokauden aikana solut olivat jakautuneet noin 13 %. Reilun kuuden vuorokauden (150 h) kuluttua solujen siirrostuksesta kuoppalevyille linjan solut olivat saavuttaneet tasaisen jakautumissyklin normoksisissa olosuhteissa. Hypoksiassa kasvaneiden solujen kasvutrendi (kuva 15) kääntyi laskuun kahden vuorokauden kuluttua siitä, kun solut oli siirretty hypoksiakaappiin. Tätä seuranneen kolmen seuraavan vuorokauden aikana solujen kasvua kuvaava trendi oli laskeva ja jyrkempi kuin määrityksen kuvaaja neljän viimeisen vuorokauden aikana. Neljän viimeisen vuorokauden aikana trendi muuttui puolelta välillä, mutta tämän määrityksen aikana solujen lisääntyminen ei päihittänyt solukuolleisuutta eli trendi jatkui laskevana määrityksen loppuun saakka. Määrityksen viimeisenä päivänä kuoppien solumäärä saavutti saman suuruusluokan solukonsentraation kuin mitä kuoppalevyn kuopissa oli määrityksen aloitushetkellä. Linja osoittaa olevan hypoksinen, sillä happivaje ei vaikuttanut radikaalisti linjan solujen jakautumisen hidastumiseen analyysin aikana hypoksia-olosuhteissa. Alkuperäinen kasvain on ollut kokoluokaltaan T4 ja heikosti erilaistunut (G3) ja potilas on kuollut tautiin. Kasvaimen voidaan todeta olleen aggressiivinen, joka osaltaan kuvastaa myös sen hypoksisuutta. Molempien analyysien solut olivat samaa passagea eli 17.

UT-SCC-72 linjan solujen populaatio kaksinkertaistui normoksisissa olosuhteissa 46 tunnissa vihreällä kuvatus linjan aikana (kuva 11). Tasaisen

solujakautumisen voidaan katsoa alkaneeksi noin viiden vuorokauden kuluttua määrittelyn aloituksesta. Normoksiassa kasvatettujen solujen jakautumista kuvaavasta käyrästä voidaan nähdä, että solut toipuivat melko nopeasti siirrostuksesta, vaikka ensimmäisen vuorokauden aikana ei juuri solujakautumista tapahtunutkaan. Solut saavuttivat nopeasti tasaisen ja ripeän jakautumissyklin. Hypoksiassa tämän linjan solut reagoivat hyvin nopeasti muuttuneeseen kasvuympäristöön. Puolen vuorokauden kuluttua siitä, kun linjan solut oli siirretty hypoksiaan, ne reagoivat happivajeeseen. Solukuolleisuus oli suuri suhteessa uusiin jakautuneisiin soluihin ja tämän vuoksi kasvukäyrän kuvaaja muuttui voimakkaasti laskevaksi (kuva 16). Puolitoista vuorokautta trendi jatkui voimakkaasti laskevana, jonka jälkeen oli havaittavissa lievää solujen elpymistä, sillä laskeva trendi muuttui loivemmaksi. Laskusuhdanne jatkui tasaisena kolmen vuorokauden ajan, jonka aikana solumäärä oli romahtanut. Kasvutrendin muuttuminen jälleen positiiviseksi vaati vielä kaksi vuorokautta lisää, joiden aikana laskeva käyrä loiveni edellisestä. Kaksi vuorokautta ennen määrittelyn loppua hypoksiakasvukäyrä muuttui jälleen positiiviseksi. Pisteessä, jossa positiivinen kasvu voidaan katsoa jälleen alkaneeksi, oli soluja lähes 14 kertaa vähemmän kuin mitä määrittelyn alussa kuopalevyn kuoppiin oli pipetoitu. Määrittelyn aloitushetkellä kuopissa oli 50150 solua ja yhdeksän vuorokauden kuluttua tästä soluja oli 3612. Solumääriä ei voida pitää todellisina, sillä kaikki pipetoinnit perustuvat laskennallisiin tilavuuksiin. Kahden viimisen vuorokauden aikana sitkeimmät solut ehtivät jakaantua hypoksiassa noin 23 %. Normoksia-kasvukäyrän solut osoittavat voimakasta kasvua. Tämän solulinjan solut olivat kohtalaisen adherentteja, mutta irtosi helposti alustastaan trypsiinikäsittelyn aikana.

UT-SCC-74 linjan solujen elpyminen jaosta tapahtui ripeästi, joka voidaan nähdä kuvasta 12. Aluksi solut lisääntyivät epätaiaisissa hyvin kiivaissa sykleissä. Normoksia-olosuhteissa solut saavuttivat tasaisen jakautumistahdin vasta noin seitsemän vuorokauden kuluttua (160 h kasvatuksen aloituksesta). On myös mahdollista, että elintila alkoi rajoittaa solujen lisääntymistä, joka tasaannutti solujen jakautumisen. Parempi solukonsentraation optimointi määrittelyn alussa olisi voinut mahdollistaa helpomman tulkin.

Linjan solujen toipuminen hypoksiassa vei aikaa. Hypoksia-kasvukäyrässä (kuva 19) reilun vuorokauden hypoksiassa olon jälkeen soluja alkoi kuolla enemmän kuin mitä uusia kerkesi jakaantua. Toisin kuin UT-SCC-25 solulinjan solut, tämän linjan solut eivät reagooneet nopeasti käytettävän hapen määrän kasvuun yhtä solua kohden. Vuorokauden negatiivisen trendin jälkeen solut alkoivat jakaantua kiivaammin suhteessa niiden kuolleisuuteen. Neljän ja puolen vuorokauden ajan solut lisääntyivät hitaasti kasvutrendin ollessa positiivinen. Tämän jälkeen solut tukahtuivat jälleen happivajeeseen ja solujen määrä laski lähes yhtä jyrkästi kuin ensimmäisen laskevan trendin aikana. Tämän määrittelyn aikana solulinja ei saavuttanut enää positiivista trendiä eli uusia soluja jakaantui vähemmän suhteessa solujen kuolleisuuteen.

Normoksiassa tämän linjan solut saavuttivat 59 tunnin generaatioajan aikavälillä 160 h – 191 h. Tämän solulinjan kasvun tulkinta oli hankalaa, sillä solut jakautuivat nopeasti, mutta pitkää, selkeän tasaista kasvusykliä ei saavutettu. Tämän solulinjan kohdalla otettiin tulkintaan mukaan myös aikaisempi kokemus solulinjan kasvattamisesta verrattuna muihin käytettyihin solulinjoihin.

Jokaisesta normoksia-kasvukäyrästä on kuvaaja myös puolilogaritmisessa asteikossa kts. liite 5. Liitteen 5 kuvaajista käy hyvin ilmi solulinjojen epätasaiset ja määrittelyn aikana muuttuvat jakautumissyklit. Esimerkkilasku generaatioajan laskemisesta kts liite 4.

Tulkittaessa hypoksiakasvukäyrien trendien suuntaa täytyy muistaa, että trendi ei osoita solujekuolleisuuden ja jakautumisen absoluuttista suhdetta. On siis mahdollista, että loivan positiivisen trendin aikana soluja ei juuri kuole, mutta uusien solujen jakautumissykli on hyvin hidas. Toisaalta yhtä hyvin tilanne voi olla se, että soluja jakautuu hyvin kiivaasti, mutta myös solukuolleisuus on runsasta. On myös huomioitava, että kasvukäyrämäärittysten solumääriä ei voida pitää absoluuttisina, sillä kaikki pipetoinnit perustuvat laskennallisiin tilavuuksiin.

4.3 Säderesistenssimäärittäminen

Säderesistenssimäärittämyksen eloonjäämiskäyrän y-akseli kuvaa eloonjäämistä soluihin kohdistetuista sädeannoksista, jotka on esitetty x-akselilla. AUC arvo kuvaa solujen sisäistä sädeherkkyttä (laskuesimerkki liitteessä 4).

Pekkola-Heinon (1992) tutkimuksessa on luokiteltu korkeimmalla arvolla sädeherkäksi solulinja, jonka AUC arvoksi saatiin $1,5 \pm 0,3$. Pienimmällä arvolla säderesistentiksi on samassa tutkimuksessa analysoitu linja, jonka AUC arvo oli $2,6 \pm 0,5$ ³⁹. Tutkimuksessaan Pekkola-Heino (1992) oli käyttänyt joukkoa pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomista eristettyjä solulinjoja.

UT-SCC-70 hypoksiakäyrän antamien tulosten mukaan linjan solut sietivät hypoksiaa. Vaikka solujen jakautumisessa tapahtui notkahdus hypoksiaolosuhteissa, solut jatkoivat silti jakautumistaan läpi koko määrittämyksen. Tällä voidaan osoittaa linjan solujen olevan jossain määrin hypoksisia. Koska hapen läsnäololla on merkittävä rooli kudoksen sädevasteessa puoltaa hypoksia-kasvukäyrän tulos sekä Pekkola-Heinon tutkimustulokset sitä, että AUC arvolla 2,22 (kuva 18) linjan solut ovat säderesistenttejä. Säderesistenssimäärittäminen määritettiin passagen 17 soluista.

Tarkasteltaessa UT-SCC-72 p 20 säderesistenssimäärittäystä (kuva 19) ja hypoksiakäyriä (kuva 16) voidaan todeta, että säderesistenttisyys AUC arvolla 2,84 ovat saattaneet vaikuttaa linjan sitkeät solut, jotka hypoksiaolosuhteissa jatkoivat kasvuaan usean päivän kestäneen negatiivisen kasvutredin jälkeen. Eloojäämiskäyrät on määritetty eloonjäämisosuuksien ja sädetysannosten perusteella (kts. taulukko 6 ja 7).

5 YHTEENVETO

Tulokset osoittavat, että niiden solulinjojen, joilla oli nopeampi generaatioaika normoksiassa, kasvuvauhti hidastui oleellisesti hypoksia-olosuhteissa verrattuna hitaamman generaatioajan saavuttaneisiin solulinjoihin. Ne solulinjat, joilla oli hitaampi generaatioaika hidastivat, mutta jatkoivat selkeästi jakautumistaan hypoksia-olosuhteissa.

Luotettavampien tulosten saavuttamiseksi tulisi menetelmistä tehdä useampia rinnakkaismäärittäyksiä ja esittää tulokset keskiarvoina ja niistä poikkeavina hajontana. Tämä koskee niin kasvukäyrämäärittystä kuin säderesistenssimäärittäystäkin. Koska kyseessä on biologinen materiaali, on yksittäisten tulosten aiheuttama mahdollinen hajonta täysin luonnollinen. Tulosten luotettavuutta voidaan parantaa myös varmistumalla siitä, että vain elinvoimaiset solut lasketaan kasvukäyrämäärittäyksessä. Tämä voidaan mahdollistaa värjäystekniikalla, joka erottaa hyväkuntoiset solut kuolleista. Emme voi myöskään olla varmoja kasvatusmediumin happipitoisuudesta suhteessa ympäröivän ilman happipitoisuuteen. Koska solut kykenevät hyödyntämään vain nesteeseen liuenneen hapen olisi hapen liukenemisen tehostamiseksi hyvä suorittaa solukasvatukset ravistelualustalla. Jos määrittäyksissä kuoppien solulaskuajankohdat olisivat olleet jokaiselle linjalle samat, olisi se helpottanut tulosten tarkastelua pelkkien käyrien avulla. Lisäarvoa kasvukäyrätuloksiin olisi antanut kauemmin kestävä analyysit. Erittäin mielenkiintoiseksi jäi esimerkiksi se, mitä olisi tapahtunut linjan UT-SCC-72 soluille hypoksiassa sen jälkeen kun trendi kääntyi nousuun. Voivatko nämä sitkeät yksilöt aiheuttaa linjan hypoksisuuden ja kuinka kauan solut olisivat jatkaneet lisääntymistään? Mielenkiintoista olisi ollut myös nähdä olisiko linjan UT-SCC-74 solujen jakautumisen suhde solukuolleisuuteen kääntynyt vielä positiiviseksi hypoksia-olosuhteissa. Aikarajoitusten vuoksi tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista. Näistä analyysien kehittämisideoista huolimatta jokaisesta analyysistä saatu tulos antoi lisäarvoa alkuperäiselle tutkimukselle.

LÄHTEET

- 1 Knuuti J (2004) Positron emission tomography - molecular imaging of biological processes. International Congress Series volume 1265, August 2004, pages 248-254
- 2 www.sry.fi/index.php?65, SI Antikainen, Mitä radiologin tulee tietää PET:sta 17.4.2010 klo 19:00
- 3 www.idisk.mac.com/liisa.halkka/Public/liisan.tyot/KrMaa99/KrMaalHM/cancer.html 8.4.2010 klo 19:00
- 4 www.cancerregistry.fi/tilastot/, image_67.pdf 12.4.2010 klo 18:00
- 5 Brennan J, Boyle J, Koch W, Goodman S, Hruban R, Eby Y, Couch M, Forastiere A, Sidransky D (1995) Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The England Journal of Medicine* 332(11):712-717
- 6 Vokes E.E, Weichselbaum R.R, Lippman S.M, Hong W.K (1993) Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine* 328:184-194
- 7 Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001) Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine* 345(26):1890-1900
- 8 Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR (2005) Profiling early head and neck cancer. *Nature Reviews* 5:127-135.
- 9 Liebertz D.J, Lechner M.G, Masood R, Sinha U.K, Hang J, Puri R.K, Correa A.J, Epstein A.L (2010) Establishmet and Characterization of a Novel Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Line USH-NH1. *Head and Neck Oncology* 2:5
- 10 Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research* 48:3282-3287
- 11 Lucenteforte E, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C (2008) Dietary factors and oral pharyngeal cancer risk. *Oral Oncology* 45:461-467.
- 12 Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 92(9):709-720
- 13 www.caring4cancer.com/go/skin/basics/what-is-nonmelanoma-skin-cancer.htm 20.4.2010
- 14 Janes S, Watt F (2006) New roles for integrins in squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Cancer* 6:175-183
- 15 www.solunetti.fi/fi/patologia/dysplasia 18.4.2010 klo 14:00
- 16 www.solunetti.fi/fi/patologia/karsinooma 18.4.2010 klo 14:10
- 17 Sobin L, Fleming I (1997) TNM classification of malignant tumors. *Cancer* 80(9):1803-1804
- 18 Gospodarowicz M, Miller D, Groome P, Greene F, Logan P, Sobin L (2003) The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer* 100(1):1-5
- 19 Patel SH, Shah JP (2009) TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *A Cancer Journal for Clinicians* 55:242-258

- 20 www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/tumor-grade 15.2.2010 klo 18:00
- 21 Phelps (2000) PET: The Merging of Biology and Imaging into Molecular Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine* 41(4):661-681.
- 22 Brown JM, Giaccia AJ (1998) The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Research* 58:1408-1416
- 23 Stuschke M, Thames HD (1997) Hyperfractionated radiotherapy of human tumors: overview of the randomized clinical trials. CRD-database number: DARE-970464. *J Radiat Oncol Biol Phys* 37:259-67
- 24 www.tricountyoms.com/oral_cancer/premalignant_lesions.html 12.4.2010 klo 19:00
- 25 Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC (1953) The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26:638-648
- 26 Brown J, Wilson W (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer* 4:437-447
- 27 Lahtinen T, Holsti LR, Kliininen säteilybiologia, Helsinki: Duodecim, 1997, 196s
- 28 Kirsi Pekkola-Heino, Misa Jaakkola, Jarmo Kulmala, Reidar Grénman (1995) Comparison of cellular radiosensitivity between different localizations of head and neck squamous-cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 121:452-456
- 29 Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285:1182-1186
- 30 Isa A, Ward T, West C, Slevin N, Homer J (2006) Hypoxia in head and neck cancer. *The British Journal of Radiology* 79:791-798
- 31 Horsman MR (1998) Measurement of tumor oxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42:701-704
- 32 Lund EL, Kristjansen PEG (2006) Pahanlaatuinen fenotyyppi. *Suomen Hammaslääkärilehti* 13:195-200
- 33 Minn H, Jaakkola O (2005) Kasvainhypoksia: haitta vai mahdollisuus?. *Duodecim* 121:1601-1604
- 34 Feron O (2009) Puryvate into lactate and back: From the Warburg effect to the symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*
- 35 Grönroos T, Minn H (2007) Imaging of tumor hypoxia using PET and 18F-labelled tracers: biology meets technology. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 34:1563-1565
- 36 Munshi A, Hobbs M, Meyn RE (2005) Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med* 110:21-8
- 37 Sähköposti Suilamo Samilta/ TYKS 19.4.2010
- 38 Henriksson E, Kjellén E, Baldetorp B, Bendhal P, Borg Å, Brun E, Mertens F, Ohlsson T, Rennstam K, Wennerberg J, Wahlberg P (2009) Comparison of cisplatin sensitivity and the 18F fluoro-2-deoxy 2 glucose uptake with proliferation parameters and gene expression in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 13:28:17

39 Pekkola-Heino K: Radiation response of squamous cell carcinomas: In vitro studies with cell lines in a 96-well plate clonogenic assay. Väitöskirja Sarja D no 96. Turun yliopisto 1992.

LIITTEET

LIITE 1: Menetelmäohjeet

LIITE 2: Käytetyt liuokset

LIITE 3: Säderesistenssimäärittäminen

LIITE 4: Tutkimustulosten analysoinnissa käytettyjä laskukaavoja

LIITE 5: Normoksia-kasvukäyrät puolilogaritmisessa asteikossa

Menetelmäohjeet

Solujen sulatus:

- Sulata soluampulli hieman hileiseksi joko kädessä tai vesihauteessa
- Siirrä 15 ml Falcon-putkeen noin 5 ml kasvatusmediumia
- Pipetoi sulaneet solut lämpimän kasvatusmediumin joukkoon
- Sentrifugoi solut 550 g / 5 min
- Heitä supernatantti pois
- Resuspentoi solupelletti 2 ml:aan lämmintä kasvatusmediumia
- Jaa liuos kahteen solukasvatuspulloon ($A=25\text{ cm}^2$)
- Lisää noin 3 ml lämmintä kasvatusmediumia kasvatuspulloihin

Solujen ylläpito:

- Vaihda kasvatusmediumi soluviljelypulloihin noin kaksi kertaa viikossa riippuen solulinjan kasvusta (T-25 soluviljelypullot 4,5 ml mediumia)

Solujen jakaminen T-25 kasvatuspullosta:

- Pipetoi soluviljelypullosta kasvatusmedium pois
- Huuhtelee solut 2 × PBS:lla
- Lisää 3 ml irrotusliuosta
- Inkuboi 2-8 min 37 °C
- Lisää 10 ml kasvatusmediumia

- Siirrä seos 15 ml:n falcon-putkeen
- Sentrifugoi 5 min 750 g
- Kaada suspensio pois
- Resuspentoi solupelletti 2-3 ml kasvatusmediumia
- Pipetoi solususpensiota 1 ml yhteen kasvatuspulloon
- Lisää 4 ml kasvatusmediumia soluviljelypulloon
- Aseta kasvatuspullo heti pystyasentoon
- Kasvatuspullo soluinkubaattoriin (CO₂ 5 %, +37 °C)

Solujen pakastus:

- Valmista pakastusliuos ja laita se jälle kylmään jäähtymään
- Merkitse pakastusputkiin (cryoputki) solulinja, siirrostunumero, pvm, omat nimikirjaimet, sekä solulinjan muut tiedot kasvatuspullon kyljestä
- Kaada soluviljelypullosta kasvatusmedium pois
- Huuhtelee solut PBS:lla
- Lisää 3 ml irrotusliuosta
- Inkuboi enintään 5 min / 37 °C
- Lisää 10 ml kasvatusmediumia
- Siirrä seos 15 ml:n falcon-putkeen
- Sentrifugoi 5 min / 750 g
- Kaada suspensio pois

- Resuspentoi solupelletti 350 µl:aan kasvatusmediumia
- Kokonaistilavuus kasvaa n. 500 µl:aan, sillä falcon-putkeen jää aina pieni määrä liuosta
- Siirrä pakastusputkeen (cryoputki) 500 µl soluliuosta
- Lisää pakastusliuosta 500 µl soluliuksen päälle ja siirrä pakastusputki heti jäälle
- Siirrä pakastusputki styroksiseen pakastusrasiaan, teippaa rasia kiinni ja vie rasia pystyasennossa pakkaseen (-70 °C) vähintään vuorokaudeksi
- Siirrä soluampullit pakkaseen (-135 °C tai -150 °C)

Käytetyt liuokset:

DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Gibco 42430

L-Glutamiini 100X 200 mM, Gibco 25030

MEM NEAA 100X (MEM Non Essential Amino Acids), Gibco 11140

Penisiliini-Streptomysiini (penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 µg/ml),

Gibco 15140

FBS (Foetal Bovine Serum), Gibco 10106

HBSS 1X (Hanks' Balanced Salt Solution), Gibco 14170

0.5 % Trypsiini-EDTA 10X, Gibco 15400

PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline pH 7.2), Gibco 20012 / Lonza 17-516F

Ham's F-12 PromoCell C-72120

Dimetyylisulfoksidi DMSO

Kasvatusmedium:

- 500 ml DMEM
- 5 ml L-glutamiini
- 5 ml MEM NEAA
- 640 µl penisiliini ja streptomysiini
- 50 ml FBS

Irrotusliuos:

- 500 ml HBSS
- 50 ml Trypsiini-EDTA

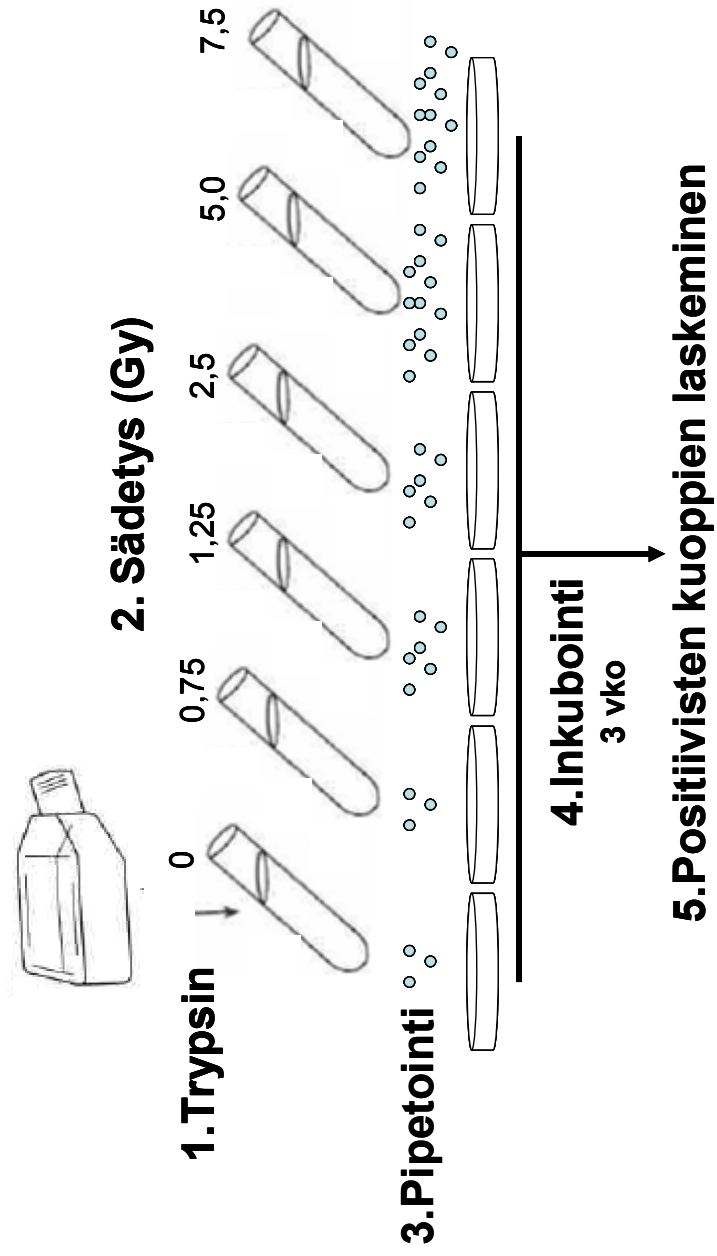
Pakastusliuos:

Loppupitoisuus	20 % DMSO
Kantaliuos	200 µl
Kasvatusmediumi	800 µl

Säderesistenssimäärittämisessä käytetty medium:

- 500 ml Ham's F-12
- 5 ml L-glutamiini
- 5 ml MEM NEAA
- 340 µl penisiliini ja streptomysiini
- 75 ml FBS

Säderesistenssimääritys



Tutkimustulosten analysoinnissa käytettyjä laskukaavoja

Generaatioaika

Esim. UT-SCC-8 p 30 generaatioaika g, 1/k

$$k = \frac{\log(N_t) - \log(N_0)}{\log(2)_t}$$

$$k = (\text{LOG10}(273612) - \text{LOG10}(154815)) / (\text{LOG10}(2) \times 47)$$

$$= 0,0175 \text{ sukupolvea/h}$$

$$g = 1/k = \underline{57 \text{ h}}$$

Eloonjäämisosuus eli surviving fraction

$$SF = \frac{(\text{positiivisten kuoppien määrä} / \text{pipetoitu solumäärä}) \times \text{kontrollikuoppaan pipetoitu solumäärä}}{\text{positiivisten kuoppien määrä kontrollikuoppalevyllä}}$$

Esim. UT-SCC-70 p17 –linja, sädetysannos 1,25 Gy ja 2.määritys

$$SF = \frac{(83 / 6) \times 3}{71,5} = 0,580$$

AUC-arvon laskeminen

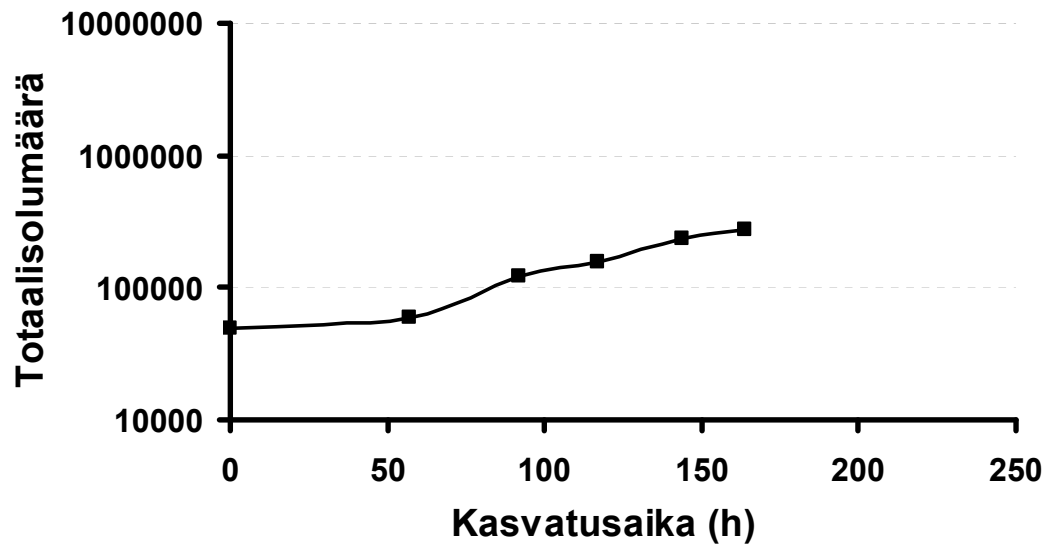
Esim. UT-SCC-70 p17 –linjan AUC-arvo

$$y = 2,1758e^{-0,8039x}$$

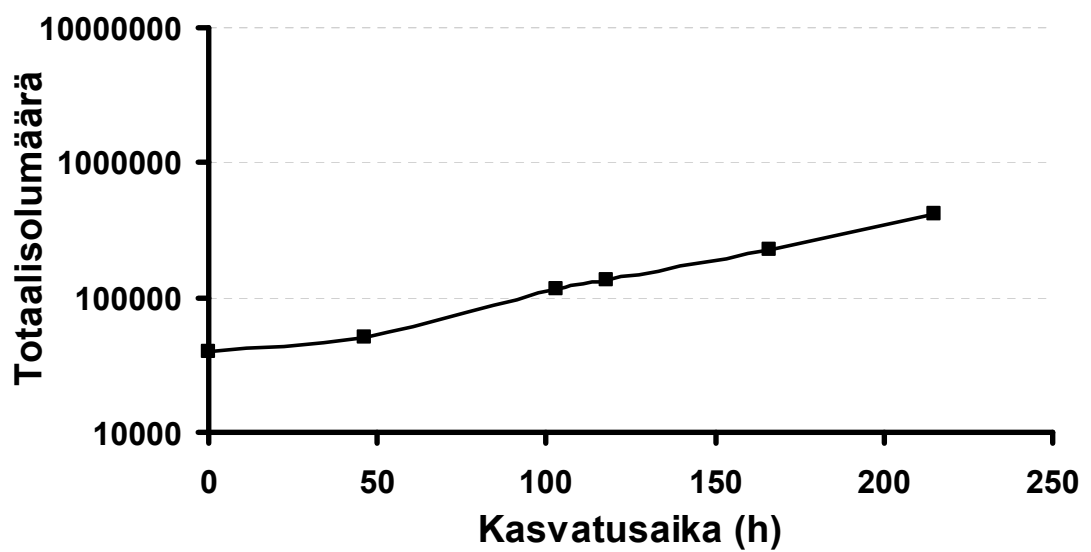
$$AUC = \left(\int_{0,75}^{7,5} 2,1758e^{-0,8039x} \right) + (0,75 \times 0,99) = \underline{\underline{2,22}}$$

Normoksia-kasvukäyrät puolilogaritmisessa asteikossa

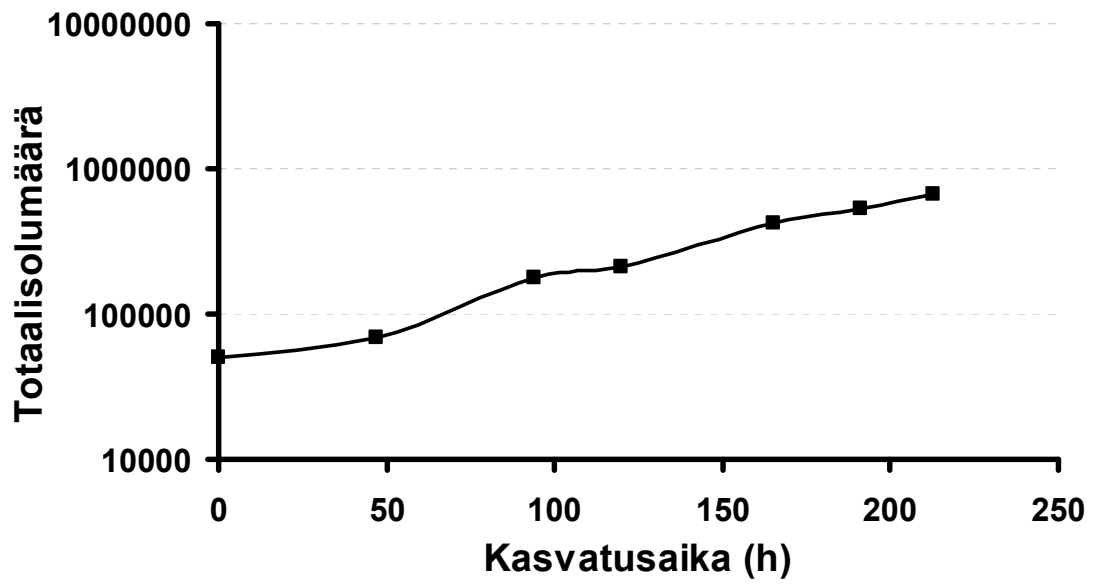
UT-SCC-8 (p30)



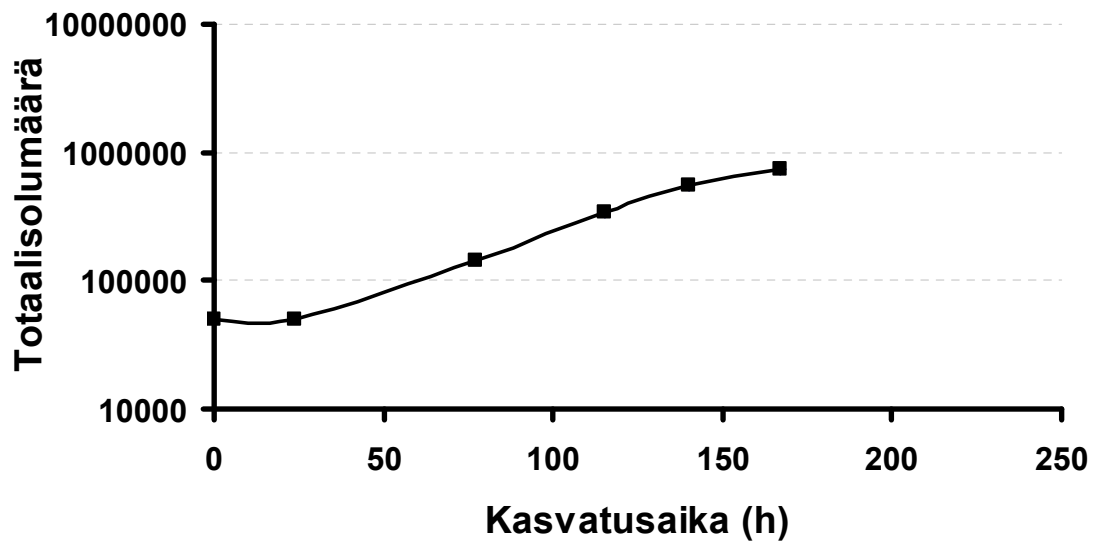
UT-SCC-25 (p5)



UT-SCC-70 (p24)



UT-SCC-72 (p17)



UT-SCC-74 (p37)

